



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA MAGAGNIN BRINCAS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS2910164 NO  
GENE *MIR146A* EM PACIENTES PORTADORAS DE  
CARCINOMA ESPORÁDICO DE MAMA

CURITIBA

2018

HELOISA MAGAGNIN BRINCAS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS2910164 NO  
GENE *MIR146A* EM PACIENTES PORTADORAS DE  
CARCINOMA ESPORÁDICO DE MAMA

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Genética,  
Departamento de Genética, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de Souza  
Fonseca Ribeiro

Coorientadores: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli e  
Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Brincas, Heloisa Magagnin

Estudo de associação do polimorfismo rs2910164 no gene *MIR146A* em  
pacientes portadoras de carcinoma esporádico de mama. / Heloisa Magagnin  
Brincas. – Curitiba, 2018.

82 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Coorientador: Iglénir João Cavalli

Coorientador: Rodrigo Coutinho de Almeida

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Cancer. 2. MicroRNAs. I. Título. II. Ribeiro, Enilze Maria de  
Souza Fonseca. III. Cavalli, Iglénir João. IV. Almeida, Rodrigo Coutinho de.  
V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 574.873224



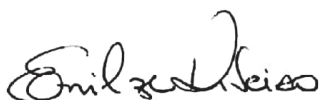
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA


## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **HELOISA MAGAGNIN BRINCAS** intitulada: **Estudo de associação do polimorfismo rs2910164 no gene MIR146A em pacientes portadoras de carcinoma esporádico de mama.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Março de 2018.

  
ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
VALÉRIA MARIA SPERANDIO ROXO  
Avaliador Externo (UFPR)

  
LIANA ALVES DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro** por ter me orientado desde o início da minha jornada científica, durante a graduação na Iniciação Científica e até agora na conclusão do meu mestrado. Por servir de exemplo e sempre me encorajar a seguir em frente mesmo diante das dificuldades. Com ela aprendi que a pesquisa vai muito além dos resultados obtidos, é um processo de construção em equipe sendo que cada descoberta, mesmo que pequena contribui para a compreensão, mesmo de assuntos tão complexos, como é o câncer.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Iglénir João Cavalli** por seu importante apoio, por suas orientações e por lembrar a todos que a pesquisa é feita de pessoas e que é o trabalho em equipe que nos permite irmos mais longe.

Ao meu co-orientador **Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida** por ser o idealizador deste projeto e nos ajudar muito durante o desenvolvimento da ideia.

A todos os meus **amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética**: Tayana, Talita, Letícia, Amanda, Evelyn, Fabiano, Érika, Paty, por toda amizade e momentos de descontração. Agradecimentos especiais à técnica Ana Luiza Mattana, por sempre estar cuidando de “tudo e todos” no Laboratório e às PVAs Natália e Paula que estiveram envolvidas na longa jornada de padronização das PCRs, poder compartilhar meus conhecimentos com vocês me motivou a fazer o projeto acontecer.

Ao pessoal do **Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade** pela disposição em ajudar e por sempre me receberem bem e me permitirem usar os equipamentos sem os quais este projeto não teria sido possível.

Ao **Prof. Dr. Danilo Augusto**, por ter me ajudado muito com o planejamento da parte experimental do projeto e por todos os ensinamentos que me auxiliaram na conclusão do projeto.

Ao **Leonardo Amorim**, por toda amizade e trabalho em equipe, diluindo e quantificando amostras, tirando dúvidas sobre a padronização da curva de melting e por ter aceitado o desafio de organizar comigo o XCIG em 2017.

Aos membros da **Banca de Acompanhamento** do projeto e do relatório, Profa. Dra. Danielle Malheiros, Profa. Dra. Jaqueline Oliveira, Profa. Dra.

Daniela Gradia e Dr. Gabriel Cipolla pelas sugestões durante o desenvolvimento da dissertação.

Aos médicos do **Hospital Nossa Senhora das Graças** que sempre estão colaborando em nossas pesquisas e que nos possibilitam a obtenção das amostras para os projetos.

Aos **meus grandes amigos** Carol, Gui e Simone que estiveram comigo em toda essa caminhada compartilhando os momentos bons e os difíceis, sempre oferecendo o apoio e a alegria nos momentos certos.

Às minhas **amigas do curso de biologia** que estiverem presentes durante o período de desenvolvimento do projeto seja compartilhando experiências e dicas, seja nos momentos de descontração: Regiane, Carol Rosa, Larissa, Lívia, Giovanna, Nana, Anne, Mai e Marina.

Aos **amigos que conheci na Genética** por toda a amizade e bons momentos que compartilhamos juntos.

Ao **Caio Pitta**, que me acompanhou durante toda essa jornada do mestrado sempre me incentivando e me motivando, agradeço por todo o companheirismo e carinho.

Aos **meus pais, Cida e Mauricio**, que me apoiaram durante todo esse período me dando força, incentivo e amor, nunca duvidando de minha capacidade.

Ao **meu irmão, Heitor**, por todos os momentos de descontração e amizade sem os quais tudo teria sido mais difícil.

A **todos os pacientes participantes desta pesquisa**, por confiarem na importância da pesquisa e decidirem auxiliar para que no futuro doenças complexas como o câncer possam ser melhor compreendidas e tratadas.

À **Universidade Federal do Paraná e à CAPES**, por darem o auxílio financeiro e o espaço necessário para realizar este trabalho.

**Principalmente, a Deus**, pela saúde, força e fé que me permitiram chegar até aqui.

*"Nós continuamos seguindo em frente,  
abrindo novas portas e fazendo coisas novas,  
porque somos curiosos... e a curiosidade  
continua nos conduzindo por novos  
caminhos."  
Walt Disney*

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente na população feminina brasileira, sem considerar os tumores de pele não melanoma e mundialmente é considerado a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Tumores têm alterações genéticas que afetam os produtos da expressão gênica e, neste contexto, os microRNAs (miRNAs) desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer, modulando a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor. Polimorfismos localizados em genes que codificam miRNAs são capazes de alterar sua interação com o substrato, o RNA mensageiro, interferindo, gerando ou removendo os sítios de ligação dos miRNAs e alterando seu nível de expressão. Essas variantes genéticas podem ser de grande impacto para a biologia pois cada miRNA regula diferencialmente um grande número de alvos. No presente estudo foi avaliado o polimorfismo rs2910164, localizado na região *seed* do miR-146a, em 326 pacientes portadoras de câncer de mama esporádico e em 411 controles sem histórico de neoplasias, provenientes de uma população brasileira da cidade de Curitiba, PR. Para a genotipagem dos pacientes e controles foi utilizada a técnica de PCR-SSP e, para complementar, foram realizadas análises *in silico* para se acessar dados de expressão do *MIR146A* no banco de dados de câncer TCGA. A análise da variância e o teste do Qui-Quadrado foram utilizados, respectivamente, na comparação entre as médias das idades e na análise de parâmetros histopatológicos (invasão de linfonodos regionais, grau de diferenciação tumoral e subtipo imunoistoquímico) dentre os diferentes genótipos. O estudo de associação caso-controle indicou presença de associação positiva quando analisados os genótipos CC/GC *versus* o genótipo GG (OR=1,38 – IC95%=1,03-1,85). O teste do Qui-Quadrado de homogeneidade também foi utilizado para o teste do modelo dominante do alelo de risco (C) corroborando o resultado do OR com  $\chi^2=4,66$  e  $p<0,05$ . Nas análises dos parâmetros histopatológicos e de idade, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Nas análises *in silico* observamos uma maior expressão do *MIR146A* em câncer de mama em relação ao tecido normal, principalmente no subtipo triplo-negativo. Embora a associação do rs2910164 com o câncer de mama já tenha sido estudada anteriormente, este é o primeiro relato em uma amostra de população brasileira. Com base nestes resultados, concluímos que, nesta amostra, a variante alélica C do rs2910164 está positivamente associada com a suscetibilidade ao câncer de mama, mas não influencia na progressão da doença.

Palavras-chave: rs2910164; miR-146a; Câncer de mama; População brasileira.



## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent type of cancer in the Brazilian female population, without taking into account non-melanoma skin cancer and it is considered the leading cause of death by cancer among women worldwide. Tumours have genetic alterations that affect the products of gene expression and, in this context, microRNAs (miRNAs) play an important role in cancer development by modulating the expression of oncogenes and tumour suppressor genes. Polymorphisms located in genes encoding miRNAs are capable of altering their interaction with substrate, messenger RNA, by interfering, generating or removing miRNA binding sites and by altering their expression levels. These genetic variants can be of great impact for biology, since each miRNA differentially regulates a large number of targets. In the present study, the polymorphism rs2910164, located in the seed region of miR-146a, was evaluated in 326 patients with sporadic breast cancer and in 411 controls with no history of neoplasia, from a Brazilian population from Curitiba, PR. For genotyping patients and controls, PCR-SSP technique was used and, in addition, *in silico* analysis were performed to access the expression levels of *miR146A* in TCGA datasets. The analysis of variance and the chi-square test were used, respectively, in the comparison between the means of age and the analysis of histopathological parameters (regional lymph node invasion, degree of tumour differentiation and immunohistochemical subtype) among different genotypes. The case-control association study indicated a positive association when we analysed CC/GC genotypes *versus* GG genotype (OR=1.38, 95%CI=1.03-1.85). The chi-square homogeneity test was also used to test the dominant model of C-risk allele, corroborating the OR result with  $\chi^2= 4.66$  and  $p<0.05$ . In the analysis of histopathological and age parameters, no statistically significant differences were detected. We observed in the *in silico* analysis a greater expression of *MIR146A* in breast cancer compared to normal tissue, especially in triple-negative subtype. Even though the association of rs2910164 has already been studied previously, this is the first report in a sample of Brazilian population. Based in these results, we conclude that in this sample, the C allele variant of rs2910164 is positively associated with breast cancer susceptibility, but does not influence the disease progression.

Keywords: rs2910164. miR-146a. Breast Cancer. Brazilian Population.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- CARACTERÍSTICAS COMUNS AO CÂNCER.....	19
FIGURA 2 - CARCINOMA DUCTAL MAMÁRIO .....	23
FIGURA 3 - CARCINOMA LOBULAR MAMÁRIO .....	23
FIGURA 4 - CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O STATUS DOS RECEPTORES HORMONAIS E DE RECEPTOR HER2 POR ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA .....	27
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA BIOGÊNESE DO miRNA.....	28
FIGURA 6 - ESTRUTURA DO miRNA E SUA INTERAÇÃO COM O mRNA .....	29
FIGURA 7 - EFEITOS DE SNPS LOCALIZADOS EM SEQUENCIAS DE PRI- miRNA.....	32
FIGURA 8 - SNPS LOCALIZADOS EM SEQUENCIAS DE PRE-miRNA.....	32
FIGURA 9 - EFEITO DE SNPS LOCALIZADOS NA REGIÃO <i>SEED</i> DE miRNAS .....	33
FIGURA 10 - RESUMO DOS ALVOS DO miR-146A .....	37
FIGURA 11 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO miR-146A E POLIMORFISMO RS2910164.....	41
FIGURA 12 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DOS FRAGMENTOS .....	52
FIGURA 13 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PREVISTO PARA O RS2910164 .....	62

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- FREQUÊNCIA DO SNP RS2910164 NAS DIFERENTES POPULAÇÕES .....	43
QUADRO 2 - SEQUENCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO.....	51
QUADRO 3 - SEQUENCIA DOS PRIMERS PARA GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO.....	53

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2018 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA* .....	20
TABELA 2 - DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM CÂNCER.....	48
TABELA 3 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE CONTROLES E PACIENTES .....	56
TABELA 4 - ANÁLISE DE OR CONSIDERANDO ALELOS E GENÓTIPOS .....	57
TABELA 5 - ANÁLISE POR QUI-QUADRADO DE HOMOGENEIDADE PARA GENÓTIPOS .....	57
TABELA 6 - ANÁLISE DE QUI-QUADRADO DE HOMOGENEIDADE PARA INVASÃO DE LINFONODOS E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL	58
TABELA 7 - ANÁLISE DE QUI-QUADRADO DE HOMOGENEIDADE PARA SUBTIPOS IMUNOISTOQUÍMICOS.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UTR	- <i>untranslated region</i> (região não traduzida)
APC	- <i>Adenomatous polyposis coli</i> (Polipose adenomatosa do colon)
CK5/6	- Citoqueratinas de padrão basal
EGF	- <i>Epidermal growth fator</i> (Fator de crescimento epidérmico)
EGFR/HER1	- <i>Epidermal growth factor receptor</i> (Receptor de fator de crescimento epidérmico)
ER	- <i>Estrogen receptor</i> (Receptor de Estrogênio)
GL	- Grau de Liberdade
GWAS	- <i>Genome-Wide Association Studies</i> (Estudos de associação ampla do genoma)
HER2/ERRBB2	- <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> (Receptor de Fator de Crescimento epidermal 2)
HNSG	- Hospital Nossa Senhora das Graças
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
LLC-B	- Leucemia linfoide crônica de células B
MAF	- <i>Minor allele frequency</i> (Alelo de menor frequência populacional)
miRNA	- microRNA
mRNA	- RNA mensageiro
NGF	- <i>Nerve growth fator</i> (Fator de crescimento nervoso)
NK	- <i>Natural Killers</i>
nt	- Nucleotídeos
OR	- <i>Odds Ratio</i> (Razão de chances)
pb	- Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PCR-SSP	<i>Polymerase chain reaction sequence-specific primers</i> (PCR com primer de sequência específica)
PR	- <i>Progesterone receptor</i> (Receptor de Progesterona)
pre-miRNA	- <i>Precursor microRNA</i> (microRNA precursor)
pri-miRNA	- <i>Primary transcripts</i> (transcrito primário)

PTTG1	- <i>Pituitary tumor-transforming gene 1</i> (gene transformador de tumores hipofisários 1)
RISC	- <i>RNA-induced silencing complex</i> (Complexo silenciador induzido por RNA)
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
TCGA	- <i>The Cancer Genome Atlas</i> (Atlas do Genoma do Câncer)
TEM	- Transição Epitelial Mesenquimal
VEGF	- <i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
2.1	O CÂNCER	18
2.2	A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER DE MAMA	20
2.3	CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA	21
2.4	CARACTERÍSTICAS DOS microRNAs	27
2.5	POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO ( <i>SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM</i> )	31
2.6	SNPS EM miRNAs	31
2.7	SNPS EM microRNAs ASSOCIADOS AO CÂNCER	33
2.8	SNPS EM microRNAs ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA	34
2.9	MIR-146A	36
2.10	miR-146A E O POLIMORFISMO rs2910164	39
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	47
5.2	EXTRAÇÃO DE DNA	48
5.3	SELEÇÃO DE SNPS	50
5.4	GENOTIPAGEM POR PCR-SSP	50
5.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE MIRNAS NO TCGA	53
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>56</b>
6.1	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS	56
6.2	ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	57
6.3	ANÁLISE DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E IDADE	58
6.4	EXPRESSÃO DO GENE <i>MIR146A</i> NAS AMOSTRAS DO TCGA	59

6.5	CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO GENE <i>MIR146A</i> E A EXPRESSÃO DO GENE BRCA1 NAS AMOSTRAS DO TCGA .....	61
6.6	RESULTADO DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO NO ENSEMBL .....	62
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
	<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a quinta causa de morte por câncer no mundo e a mais frequente em mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, o câncer de mama é o primeiro tipo de câncer mais frequente na população feminina, sem considerar os tumores de pele não melanoma, sendo o risco estimado para as regiões Sul e Sudeste respectivamente de 73,07 e 69,50 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). A taxa de mortalidade por câncer de mama apresenta uma curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 13,03 óbitos/100.000 mulheres em 2014 (valores ajustados pela população mundial) (INCA, 2015).

Estudos Genômicos de Associação (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) encontraram que cerca de 90% dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) associados a doenças complexas estão mapeados em regiões até então consideradas não codificadoras de proteínas, incluindo regiões que são transcritas em microRNAs (miRNAs) (HRDLICKOVA *et al.*, 2014).

MiRNAs são uma classe altamente conservada de RNAs pequenos (~19-22 nucleotídeos), endógenos e não codificantes que desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer modulando a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor (CROCE, 2009). Polimorfismos localizados em miRNAs são capazes de alterar sua interação com o RNA mensageiro (mRNA), interferindo, gerando ou removendo os sítios de ligação e alterando seu nível de expressão (UPADHYAYA *et al.*, 2015). Essas variantes genéticas podem ser de grande impacto para a biologia celular, pois cada miRNA regula diferencialmente um grande número de alvos, o que torna muito provável que dois ou mais genes codificantes de proteínas de diferentes vias moleculares ou de vias que interagem entre si sejam modulados. Já existem evidências de que variantes genéticas nos genes que codificam miRNAs alteram o processamento e/ou o alvo dos miRNAs humanos e alteram os riscos de desenvolvimento de câncer (SHEN *et al.*, 2008).

Dessa forma, a identificação de polimorfismos que afetem a função ou a expressão gênica e contribuam na suscetibilidade ao câncer de mama são



importantes na predição de riscos individuais e populacionais e na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da doença (LIAN; WANG; ZHANG, 2012).

A região crítica para a ligação do miRNA maduro a um mRNA alvo é a região do segundo ao oitavo nucleotídeo da sua extremidade 5', chamada de "região *seed*", que se liga ao seu sítio alvo em um mRNA por complementaridade de bases. Em geral, estudos de sequenciamento mostram que SNPs nos genes que dão origem aos miRNAs, especificamente aqueles localizados nas regiões *seed* dos miRNAs, são muito raros, o que está relacionado com a pressão seletiva a qual estão sujeitos (RYAN; ROBLES; HARRIS, 2010).

Neste projeto, selecionamos o SNP rs2910164 localizado em região *seed* do miR-146a, cujo alelo de menor frequência populacional (MAF) apresenta frequência de 24% na população geral no banco de dados dbSNP. O gene *MIR146A* apresentou expressão aumentada em pacientes com câncer de mama do subtipo triplo-negativo em relação a pacientes não triplo-negativos, em análise realizada em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (SUGITA *et al.*, 2016). Este polimorfismo já foi estudado em algumas populações por conferir maior ou menor risco de desenvolvimento de câncer, porém, nenhum estudo foi realizado com população de origem brasileira. Para investigar o efeito deste SNP no câncer de mama em uma amostra da população brasileira, realizamos um estudo de associação do tipo caso-controle com 326 pacientes de câncer de mama e 411 controles, ambas originárias de Curitiba, PR.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O CÂNCER

O câncer é um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado e desenfreado de células anormais que possuem potencial invasivo (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

O câncer parece se desenvolver progressivamente, com graus de anormalidade crescentes até chegar às formas mais agressivas e invasivas (COOPER; HAUSMAN, 2007). As células passam de seu estado normal para um estado de hiperplasia, em seguida de displasia e enfim de neoplasia maligna que pode evoluir em metástase.

As alterações na proliferação celular levam ao surgimento de grandes populações de células que não mais obedecem aos padrões de construção e manutenção do tecido normal. Por exemplo, observa-se que na borda dos carcinomas (aqueles cânceres que têm sua origem no tecido epitelial e que representam a maior parte dos tumores em humanos), as células cancerosas epiteliais sofrem alterações na sua expressão gênica e mudam de formato, elas começam a adquirir características de células estromais de origem mesenquimal. Essa alteração fenotípica que as células sofrem é denominada transição epitelial-mesenquimal (TEM) e possibilita a invasão de tecidos normais adjacentes, de linfonodos e da corrente sanguínea pelas células do carcinoma (KARLSSON *et al.*, 2017).

O câncer é considerado uma doença genética, pois se desenvolve a partir de alterações no DNA de uma célula, que são passadas para as suas descendentes através de multiplicação clonal (CAVENEE; WHITE, 1995). O que melhor define o comportamento das células de câncer é a perda do controle da divisão celular, elas crescem e se multiplicam sem controle, invadem regiões do corpo destinadas para outras células e as colonizam formando metástases (WEINBERG, 2014). Tumores se desenvolvem de uma maneira multifatorial sendo que fatores ambientais e fatores genéticos congênitos atuam em conjunto resultando em alterações genéticas que afetam os produtos da expressão gênica de forma quantitativa e/ou qualitativa. As alterações em câncer, inclusive mutações pontuais, amplificações, translocações etc. podem ser classificadas

como somáticas ou germinativas dependendo respectivamente se elas se originaram a partir de fatores genéticos e sua interação com o ambiente, ou se elas são alterações que já estavam presentes no indivíduo desde sua concepção (ELLISEN; HABER, 2010).

Apesar de toda a heterogeneidade, características comuns desenvolvidas pelos diferentes tipos de câncer foram sumarizadas no artigo de Hanahan e Weinberg de 2011 e são elas: instabilidade genômica e mutação, constante sinalização para proliferação celular, habilidade de contornar os supressores de crescimento, capacidade de evitar a destruição por células imunes, alcançar a imortalidade replicativa, promoção de inflamação, capacidade de invasão e metástase, indução de angiogênese, resistência à morte celular e desregulação do ciclo energético das células (FIGURA 1).

FIGURA 1- CARACTERÍSTICAS COMUNS AO CÂNCER



FONTE: HANAHAN & WEINBERG (2011).

Existem dois grupos principais de genes que se encontram alterados no desenvolvimento do câncer, são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (WEINBERG, 1994). Os proto-oncogenes são genes cuja expressão estimula o crescimento e a divisão celular. Devido a mutações pontuais, amplificações ou translocações tornam-se mais expressos e/ou seus produtos


tornam-se constitutivamente ativos, de forma dominante, sendo então denominados de oncogenes, pois sua expressão leva a uma proliferação celular anormal e à tumorigênese. Os genes supressores de tumor atuam por sua vez como reguladores negativos da proliferação celular, bloqueando a diferenciação das células, retardando a progressão do ciclo ou induzindo a morte celular por apoptose. A inativação de ambos os alelos destes genes supressores leva à proliferação desordenada das células e por isso são considerados recessivos (KNUDSON, 1971).

## 2.2 A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente na população feminina mundial e é a principal causa de morte por câncer dentre as mulheres. Estima-se que a cada ano sejam diagnosticados 1,5 milhão de novos casos de câncer de mama na população mundial e em 2015 ocorreram 570.000 mortes decorrentes de câncer de mama (WHO, 2018). Em conjunto, o câncer de mama soma 25% de todos os casos de câncer diagnosticados e 15% das mortes por câncer entre as mulheres (TORRE *et al.*, 2015).

Na população brasileira foram estimados 59.700 novos casos de câncer de mama para o ano de 2018, estimativa válida também para o ano de 2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018) (TABELA 01).

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2018 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA\*

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

FONTE: Instituto Nacional de Câncer - INCA (2018)

NOTA: \*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

São múltiplos os fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama como: a idade da primeira menstruação abaixo de 12 anos; menopausa após os 55 anos; mulheres que nunca engravidaram ou nunca tiveram filhos (nuliparidade); primeira gravidez após os 30 anos; uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal na menopausa, especialmente se por tempo prolongado; exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas; dietas hipercalóricas; sedentarismo; e predisposição genética (STEWART; WILD, 2014; INCA, 2018).

Dentro de predisposição genética estão as mutações germinativas em genes de maior ou menor penetrância, sendo que os dois genes mais conhecidos por estarem mutados no câncer de mama hereditário são os genes de alto risco, *BRCA1* e *BRCA2*. Os genes *BRCAs* são importantes genes supressores de tumor que atuam no reparo de lesões de dupla fita no DNA, no controle do ciclo celular e na apoptose (YOSHIDA; MIKI, 2004).

### 2.3 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

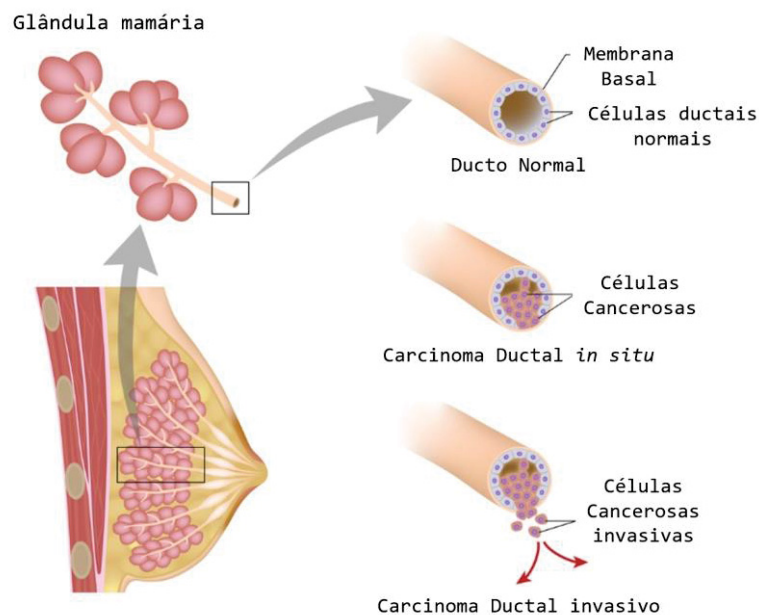
O câncer de mama é uma doença heterogênea em relação às alterações moleculares, à composição celular e aos aspectos clínicos. Os cânceres de mama apresentam em sua maioria origem epitelial (mais de 95%) (TOMASKOVIC-CROOK; THOMPSON; THIERY, 2009). As células que originam as neoplasias mamárias são em sua maioria células que revestem os ductos e os lóbulos mamários (estes carcinomas são denominados carcinomas ductais e carcinomas lobulares respectivamente). Há também tumores de mama menos frequentes, como é o caso dos tumores mucinosos, medulares, tubulares e papilares.

A primeira lesão que ocorre no processo de formação do carcinoma é a hiperplasia das células epiteliais (sem atipia citológica) e com poucas alterações genéticas. Nesta fase o aumento do número de células é autolimitado. As lesões pré-cancerosas passam então a apresentar uma elevada taxa de divisões celulares e as células começam a apresentar certo grau de atipia citológica.

Estas lesões podem progredir para a forma de carcinoma *in situ*, na qual as atipias das células se apresentam bem evidentes e há alto índice de taxa mitótica e alterações genéticas. Os carcinomas *in situ* são considerados carcinomas em que as células neoplásicas não rompem a membrana basal, proliferando-se em seu local de origem. Os carcinomas invasivos por sua vez são caracterizados pelo rompimento da membrana basal e invasão de tecidos adjacentes, iniciando assim o processo de metástase. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama representando cerca de 65% a 80% de todos os casos diagnosticados (EHEMAN *et al.*, 2009) e se origina a partir de células epiteliais dos ductos mamários (FIGURA 2). Entre os carcinomas não invasivos, o carcinoma ductal *in situ* é o que apresenta maior incidência. Outro tipo histológico de câncer de mama frequente é o carcinoma lobular o qual se origina de células epiteliais dos lóbulos mamários (FIGURA 3). Em um estudo no qual se levantou o perfil epidemiológico de pacientes com câncer de mama atendidas no Hospital Erasto Gaertner em Curitiba-PR e se analisou a distribuição percentual de 5.128 casos novos classificados por estadiamento clínico, de 1990 a 2009, foi observado que o tipo histológico mais comum foi o carcinoma ductal invasivo (83,4%), seguido pelo carcinoma lobular invasivo (4,0%), pelo carcinoma ductal *in situ* (3,0%) e pelo carcinoma mucinoso (1,1%) (MENEZES DE MEDEIROS *et al.*, 2016).

FIGURA 2 - CARCINOMA DUCTAL MAMÁRIO

## Carcinoma Ductal

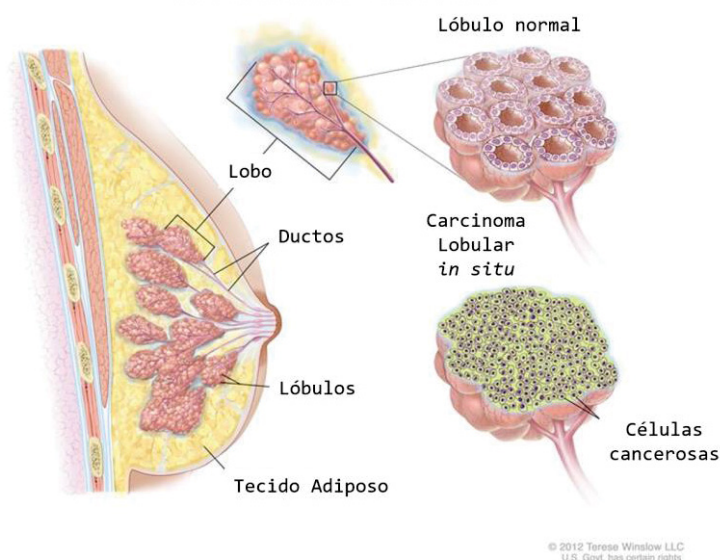


FONTE: Adaptado de <http://www.caperay.com/blog/index.php/2015/dcis-rears-its-head-again/>

LEGENDA: Ilustração representativa de câncer de mama ductal do tipo invasor e *in situ*.

FIGURA 3 - CARCINOMA LOBULAR MAMÁRIO

## Carcinoma Lobular



FONTE: disponível em <https://www.teresewinslow.com/breast/>

LEGENDA: Ilustração representativa de câncer de mama lobular *in situ*.



Uma das formas de classificação dos tumores é pelo grau de diferenciação histológica, como pleomorfismo nuclear, formação do túbulo/glândula, e atividades mitóticas para os carcinomas invasivos que classificam os tumores em: grau I (bem diferenciado, as células estão crescendo mais lentamente e se parecem mais com o tecido normal da mama), grau II (moderadamente diferenciado, características intermediárias ao I e III) e grau III (pouco diferenciado, as células não tem características normais e tendem a crescer e se disseminar de forma mais agressiva) (OLDENBURG *et al.*, 2007).

Foi o desenvolvimento da técnica de microarranjos de DNA que possibilitou uma classificação mais precisa das neoplasias mamárias, esta técnica permite a avaliação de diversas variáveis genéticas simultaneamente. Com o auxílio de recursos de bioinformática (RAKHA *et al.*, 2008) a técnica de microarranjos de DNA possibilitou que se estabelecesse uma correlação mais detalhada dos tumores no nível genômico. O primeiro trabalho a analisar expressão gênica e diversidade fenotípica no câncer de mama para determinar uma classificação molecular para as neoplasias mamárias foi realizado por PEROU *et al.* (2000). Este trabalho, posteriormente validado e ampliado por SORLIE *et al.* (2003), subdividiu os tumores de mama em cinco grupos principais: luminal A, luminal B, basal, HER2 enriquecido e “*normal like*”.

O subtipo Luminal A representa 50-60% dos casos de câncer, sendo assim o subtipo mais frequentemente observado (EROLES *et al.*, 2012). Este grupo em sua maioria apresenta positividade para os receptores de estrogênio e progesterona e negatividade para o ERBB2, também conhecido como HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), além de baixa expressão de genes de proliferação celular, como o *MKI67* que codifica a proteína Ki-67. O prognóstico para esse subtipo é favorável e por ter, em sua maioria, positividade para os receptores de estrogênio, normalmente é utilizada terapia hormonal, como o Tamoxifeno (um modulador seletivo do receptor de estrogênio), sendo a quimioterapia restrita a alguns casos específicos.

O subtipo Luminal B representa 10 a 20% de todos os casos de câncer de mama, apresenta positividade para os receptores de estrogênio e na maioria das vezes apresenta HER2 negativo (74% dos casos), porém o restante dos luminais B apresentam positividade para a expressão de HER2 juntamente com ER (EROLES *et al.*, 2012). Em comparação com o luminal A, apresentam um



fenótipo mais agressivo, um maior grau histológico e um pior prognóstico, resultantes da maior expressão de genes de proliferação, como o *MKI67* e o gene que codifica a ciclina-B1 (EROLES *et al.*, 2012). Os tratamentos comumente utilizados são a terapia hormonal e a quimioterapia.

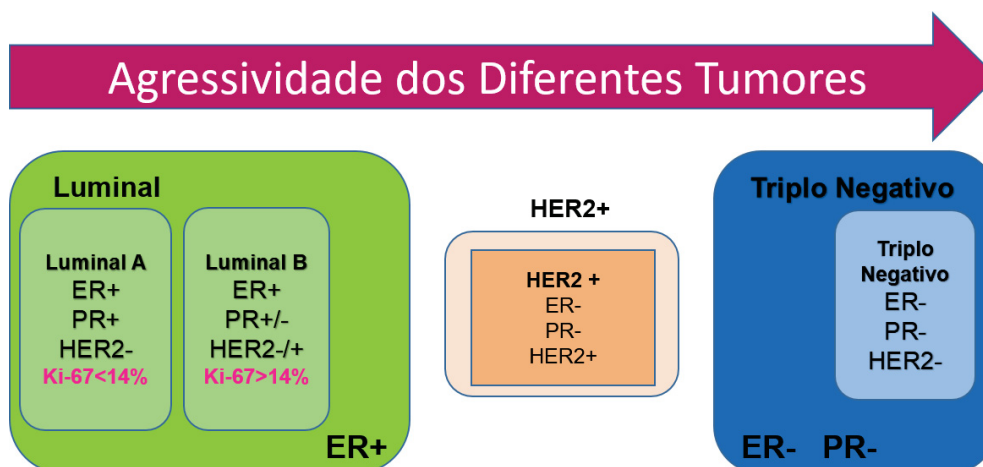
Dez a quinze por cento de todos os cânceres de mama são do subtipo HER2 enriquecido (EROLES *et al.*, 2012). Este subtipo apresenta negatividade para os receptores hormonais e alta expressão do *HER2* e genes associados, essa amplificação está correlacionada com um prognóstico ruim. A proteína HER2 quando em quantidade elevada sinaliza para que a célula mantenha um alto índice mitótico e ainda protege as células da morte celular programada (apoptose) (WEINBERG, 2014). Com um alto potencial proliferativo e alto grau histológico, o prognóstico para o subtipo HER2<sup>+</sup> não é favorável e normalmente é utilizado Trastuzumab (um anticorpo monoclonal direcionado ao receptor HER2) e quimioterapia como forma de tratamento. Na maioria dos casos apresentam melhor resposta a quimioterapia do que os subtipos luminais.

Os tumores do subtipo basal representam entre 10 a 20% dos tumores mamários apresentam negatividade para os três receptores (estrogênio, progesterona e HER2) e expressam EGFR e CK5/6, proteínas características de células epiteliais basais. Tendem a ser carcinomas ductais infiltrantes com alto índice mitótico, necrose tumoral e margens em expansão. Mesmo apresentando uma boa resposta à quimioterapia, a reincidência do subtipo basal costuma ser agressiva atingindo principalmente os linfonodos e órgãos viscerais (principalmente o pulmão) e o sistema nervoso central. Costuma apresentar alta taxa de mutação no gene supressor de tumor *TP53* e alterações nos níveis de expressão de *BRCA1* o que ajuda a explicar sua agressividade (SØRLIE *et al.*, 2001; TURNER *et al.*, 2007).

O subtipo “*normal-like*” representa entre 5 a 10% dos carcinomas mamários. Expressa genes característicos de tecido adiposo e o prognóstico é intermediário entre os subtipos luminal e o basal. Geralmente não expressam os três receptores (estrogênio, progesterona e HER2), podendo ser considerados triplo negativos sem serem considerados basais por não expressarem EGFR e CK5 (EROLES *et al.*, 2012). É provável que não representem verdadeiramente um subgrupo; acredita-se que sejam artefatos da contaminação dos microarranjos por tecido normal (EROLES *et al.*, 2012).

Devido à dificuldade de se classificar estes subtipos na rotina clínica por painel de expressão de genes, por esta ser uma técnica muito cara e não muito prática, atualmente é mais comum utilizar-se a classificação imunoistoquímica em subtipos, conforme estabelecida na 13<sup>a</sup> Conferência Internacional de St. Gallen, cujas conclusões foram descritas por GOLDHIRSCH *et al.* (2013). A classificação por imunoistoquímica ainda não é totalmente padronizada, e o mais habitual é utilizar-se como marcadores: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), HER2 e Ki-67 (proteína utilizada como marcador de proliferação celular). Classifica-se no subtipo luminal A aqueles casos em que ER e PR são positivos (PR  $\geq$  20%), não se observa superexpressão ou amplificação de HER2 e a expressão de Ki-67 é baixa, menor que 14% (a classificação em baixo ou alto Ki-67 varia entre os laboratórios, sendo que a maioria utiliza um nível de corte em 14%). Para se considerar o tumor como PR baixo utiliza-se também um nível de corte, sendo os casos com PR <20% classificados como PR baixo; isso é importante na divisão de luminal A e B (PRAT *et al.*, 2013). A classificação de luminal B mais atual considera a subdivisão em luminal B HER2 negativo e HER2 positivo. Os casos classificados como luminais B (HER2 negativo) são aqueles com ER positivo, HER2 negativo e que apresentam Ki-67 alto (acima de 14%) ou PR negativo/baixo (<20%). Os casos classificados como luminal B (HER2 positivo) apresentam expressão de ER e de HER2 simultaneamente, HER2 está superexpresso ou amplificado e os níveis de PR e de Ki-67 variam (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013). O subtipo HER2 positivo é um subtipo que compreende aqueles tumores com HER2 superexpresso ou amplificado e PR/ER negativos. E o subtipo triplo negativo é aquele que não expressa nenhum dos três marcadores clássicos (ER, PR, HER2). Existe uma sobreposição de 80% entre o subtipo imunoistoquímico triplo-negativo e o subtipo molecular intrínseco basal (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013). Informações resumidas na FIGURA 4.

FIGURA 4 - CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O STATUS DOS RECEPTORES HORMONAIS E DE RECEPTOR HER2 POR ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA



FONTE: Adaptado de GOLDHIRSCH *et al.* (2013).

LEGENDA: Receptor de Estrogênio (ER), Receptor de Progesterona (PR), Receptor de ERBB2 também conhecido como HER2 (HER2), (+) indica presença, (-) indica ausência \*no caso de HER2 significa ausência/presença de HER2 superexpresso ou amplificado.

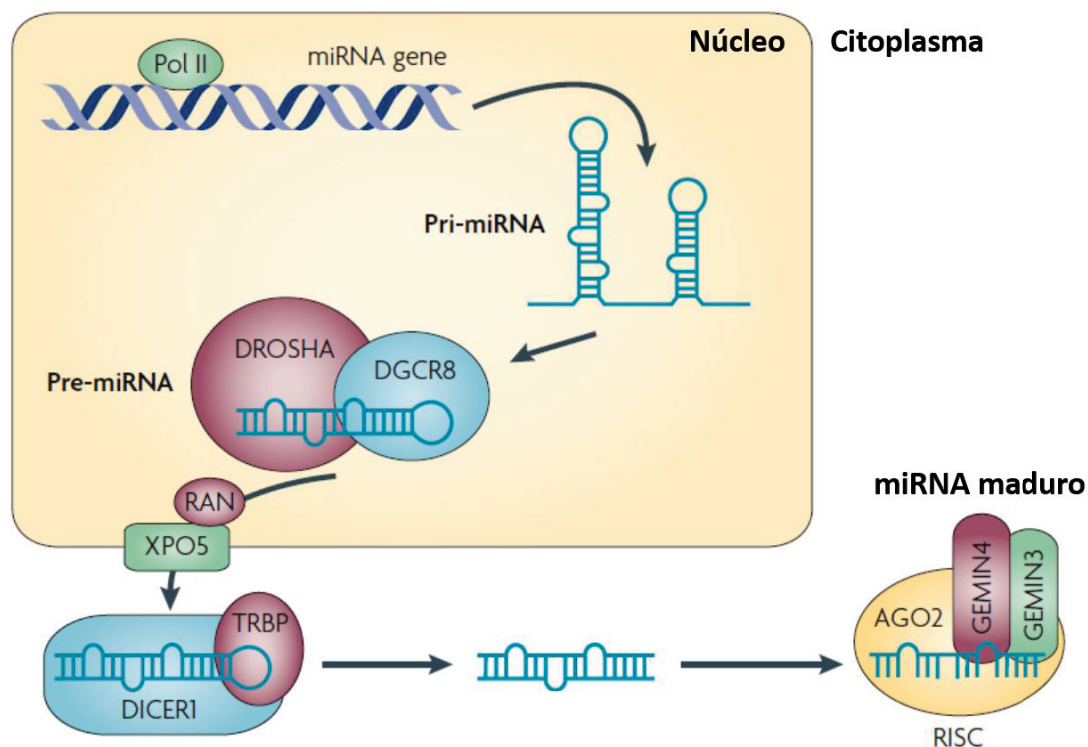
## 2.4 CARACTERÍSTICAS DOS microRNAS

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe altamente conservada de RNAs pequenos (~19-22 nucleotídeos), endógenos e não codificantes (BARTEL, 2004). Os genes de miRNAs podem estar localizados em regiões intergênicas, bem como dentro de íntrons e exons de genes que codificam proteínas (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Os miRNAs são formados a partir da transcrição pela polimerase II de um RNA longo precursor, o miRNA primário (pri-miRNA), que é processado pela RNase III (também conhecida como DROSHA) e seu cofator essencial, a proteína de ligação DGCR8, para produzir um segundo precursor (pre-miRNA) de 60-100 nucleotídeos em forma de grampo, que é transportado para o citoplasma pela exportina 5 (XPO5) (revisado por: KIM, 2015). No citoplasma o pre-miRNA é então clivado pela proteína DICER1 que se associa com a proteína TRBP e os miRNAs maduros são produzidos a partir de um dos braços do grampo, ou de ambos. A clivagem resulta em duas sequências de miRNAs de fita simples complementares, de aproximadamente 20 nucleotídeos e esses

miRNAs maduros são nomeados como miRNA-5p e miRNA-3p, dependendo do braço que lhes deu origem (CHOO *et al.*, 2014). As sequências maduras de miRNA se ligarão ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC). Uma vez incorporados ao RISC, estes miRNAs podem ligar-se a seus alvos, levando à inibição da sua tradução ou à degradação dos mRNAs (FIGURA 5).

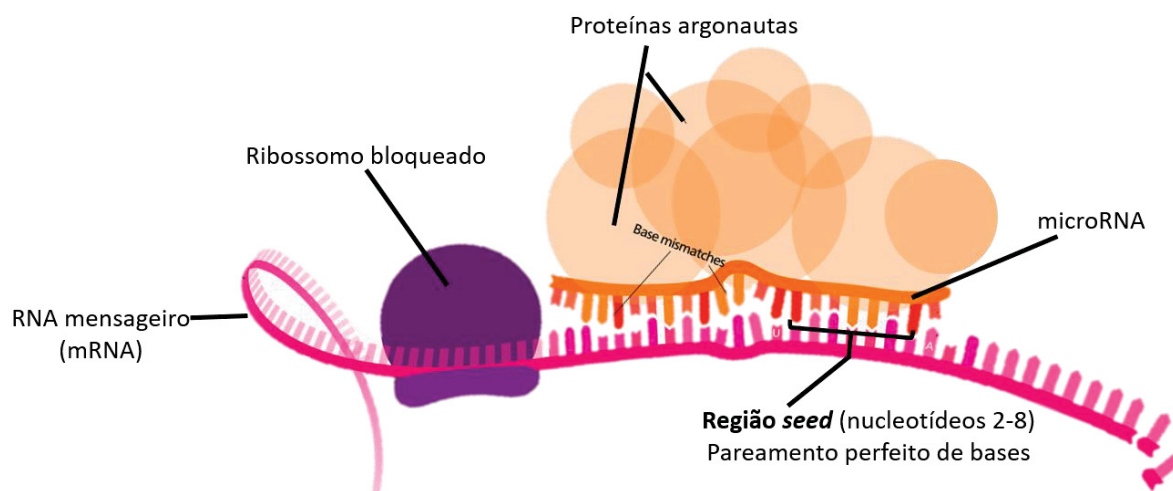
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA BIOGÊNESE DO MIRNA



FONTE: Adaptado de RYAN; ROBLES; HARRIS (2010)

A região que especifica a quais mRNAs o miRNA é capaz de se ligar constitui a sua região *seed*, que compreende os nucleotídeos 2-8 da sequência de um miRNA maduro. A complementaridade entre esta região do miRNA e o mRNA alvo na maioria dos casos é completa, enquanto que as regiões flangeadoras não precisam se ligar com tamanha complementaridade, o que gera uma região de especificidade variável (GRIMSON *et al.*, 2007). Os miRNAs interagem com os mRNAs alvos ligando-se à sua sequência complementar na 3' UTR do inglês: *untranslated region* (FIGURA 6).

FIGURA 6 - ESTRUTURA DO miRNA E SUA INTERAÇÃO COM O mRNA



FONTE: Adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/MicroRNA#/media/File:MiRNA.svg>

Inclusive, múltiplos miRNAs podem se ligar à 3' UTR de um mesmo mRNA alvo, levando assim a interações heterotípicas entre miRNA e mRNA (HON; ZHANG, 2007). A ligação entre miRNA e mRNA resulta na inibição da tradução deste mRNA ou na sua degradação, por isso consideramos a regulação feita por miRNAs como sendo pós-transcricional.

### 3.5 O PAPEL DOS miRNAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

Os miRNAs funcionam como reguladores pós-transcricionais em quase todos os processos biológicos que conhecemos e alterações nos níveis de miRNAs estão associadas ao desenvolvimento de várias doenças, inclusive ao processo de desenvolvimento do câncer. A desregulação dos níveis de miRNA ocorre em vários tipos de câncer e está associada com a iniciação, crescimento, resistência a drogas, invasão e metástase. Por isso, a modulação da expressão de miRNAs específicos é estudada como estratégia terapêutica para o tratamento do câncer, assim como a identificação dos seus alvos (IORIO;

CROCE, 2012). Os miRNAs se encontram diferencialmente expressos dependendo do tipo de tumor (LU *et al.*, 2005) e do subtipo molecular de cada tumor, como ocorre, por exemplo, no câncer de mama (BLENKIRON *et al.*, 2007).

Os miRNAs podem atuar como oncogenes ou genes supressores de tumor em diferentes situações dependendo de seus genes alvo e são diversos os mecanismos que levam a desregulação nos níveis de miRNA no câncer (PENG; CROCE, 2016). Dentre esses mecanismos destacam-se: a amplificação ou deleção dos genes de miRNA, a desregulação do controle transcricional dos miRNAs, alterações epigenéticas como hipo/hipermetilação, alterações na maquinaria responsável pela biogênese dos miRNAs e alterações nas sequências de genes dos miRNAs, como por exemplo polimorfismos nas sequências que originam os miRNAs maduros (PENG; CROCE, 2016).

São diversos os miRNAs considerados oncogênicos, ou seja, aqueles que promovem proliferação celular, invasão, migração, metástase ou o processo de TEM, sendo que já foram descritos no câncer de mama, por exemplo, miR-10b, miR-21, miR-155, miR-373 e miR-520c (VAN SCHOONEVELD *et al.*, 2015). Enquanto isso, outros miRNAs foram descritos no câncer de mama como supressores de tumor, inibindo a proliferação celular, a migração e invasão, o crescimento tumoral, metástases e TEM, ou estimulando ação anti-tumoral de células NK, são exemplos miR-125b, miR-205, miR-17-92, miR-206, miR-146b, miR-126, miR-335 e miR-31 (VAN SCHOONEVELD *et al.*, 2015). O efeito de alguns miRNAs depende também do contexto, ou do meio em que as células cancerosas estão inseridas, podendo atuar tanto como supressores quanto como promotores de tumorigênese. Como exemplo disso, temos o miR-146a e o miR-146b-5p que têm seu efeito supressor de tumor por regular negativamente NF- $\kappa$ B, porém, podem atuar como oncogenes ao reduzirem a ação do gene supressor de tumor *BRCA1* (GARCIA *et al.*, 2011).

Diferentes perfis de expressão de miRNAs específicos podem ser utilizados como marcadores de subtipo, assim como do *status* de receptores de estrogênio, progesterona e HER2 no câncer de mama, auxiliando na predição da resposta a terapias alvo, quimioterapia e radioterapia (VAN SCHOONEVELD *et al.*, 2015). Estes perfis de miRNAs já foram descritos tanto no tecido quanto circulando livres pela corrente sanguínea (AMORIM *et al.*, 2016). Como foi

revisado no trabalho de Muluhngwi e Klinge de 2017, diversos miRNAs já foram identificados como biomarcadores para a resistência a tratamentos endócrinos. Um dos mecanismos de resistência é o transporte de miRNAs por exossomos de células-resistentes para outras células não resistentes e para a corrente sanguínea (GIALLOMBARDO *et al.*, 2016).

Em resumo, os miRNAs podem auxiliar na predição do prognóstico do paciente e do desenvolvimento de resistência a tratamentos, sendo alguns miRNAs relacionados a um bom prognóstico e outros a um mau prognóstico.

## 2.5 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (*SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM*)

Polimorfismo de nucleotídeo único (em inglês *single-nucleotide polymorphism*, abreviado como SNP) é uma variação de uma única base nitrogenada na sequência de DNA do genoma que está presente na população estudada em uma frequência superior a 1%. SNPs foram pela primeira vez identificados em 1978, por Kan e Dozy ao utilizarem o método de Southern (SOUTHERN, 1975), de polimorfismo por comprimento de fragmento de restrição do DNA genômico (RFLP) para estudarem variantes no conjunto de genes da beta-globulina em casos de anemia falciforme. Com o advento das técnicas moleculares de PCR alelo específica, PCR ARMS e do sequenciamento, até hoje já foram identificados aproximadamente 15 milhões de SNPs no genoma humano. Estima-se que eles ocorram, em média, a cada 100 a 300 pares de bases (DURBIN *et al.*, 2010).

## 2.6 SNPS EM miRNAS

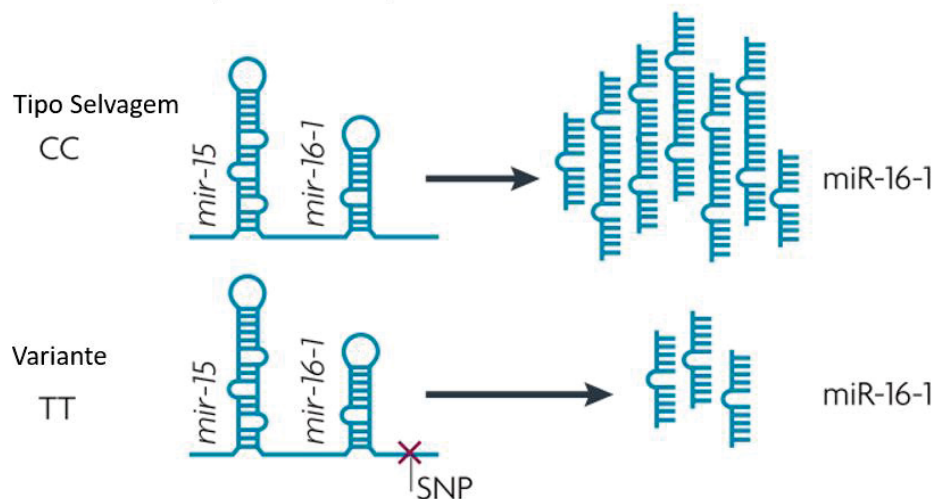
Pequenas alterações em uma sequência de miRNA podem levar a consequências fenotípicas grandes modulando sua função de três maneiras: primeiramente alterando o nível de transcrição do transcrito primário; em segundo lugar levando a um processamento alterado do pri-miRNA e do pre-miRNA (FIGURA 7 e FIGURA 8 respectivamente); e em terceiro lugar alterando



a interação entre o miRNA e o mRNA alvo (FIGURA 9) (RYAN; ROBLES; HARRIS, 2010). Dessa forma, essas variações genéticas podem influenciar o nível de expressão dos miRNAs e a sua função.

FIGURA 7 - EFEITOS DE SNPS LOCALIZADOS EM SEQUENCIAS DE pri-miRNA

**SNPs em sequências de pri-miRNA: C-T *mir-15* e *mir-16***

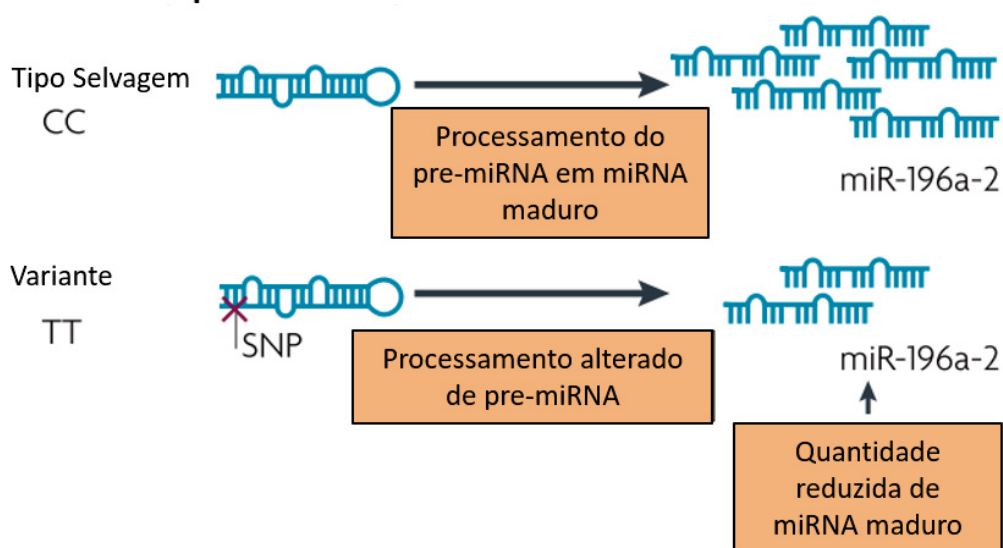


FONTE: Adaptado de RYAN; ROBLES; HARRIS (2010).

LEGENDA: Representação do efeito que SNPs localizados no pri-miRNA podem ter alterando o seu processamento e posteriormente os níveis de miRNA maduro produzidos, como acontece nas variantes em *mir-15* e *mir-16-1* da mutação germinativa descrita em pacientes de LLC-B.

FIGURA 8 - SNPS LOCALIZADOS EM SEQUENCIAS DE pre-miRNA

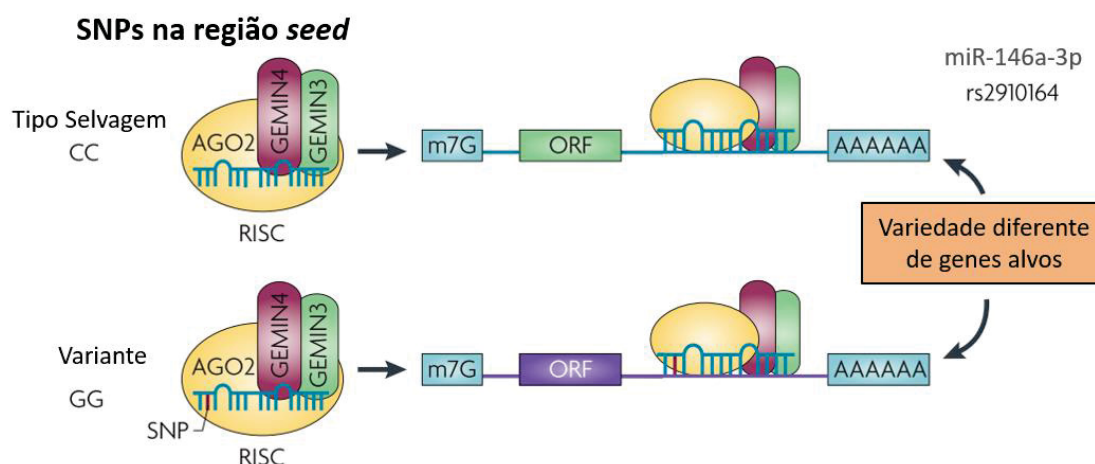
**SNPs em pre-miRNA: rs11614913 *mir-196a-2*\***



FONTE: Adaptado de RYAN; ROBLES; HARRIS (2010).

LEGENDA: Representação do efeito de SNPs localizados no pre-miRNA que alteram o seu processamento e os níveis de miRNA maduro, como é o caso do rs11614913.



FIGURA 9 - EFEITO DE SNPS LOCALIZADOS NA REGIÃO *SEED* DE miRNAs

FONTE: Adaptado de RYAN; ROBLES; HARRIS (2010).

LEGENDA: SNPs localizados na região *seed* de miRNAs são capazes de alterar sua interação com os mRNAs destruindo ou criando sítios de ligação, alterando assim a variedade de genes alvos, como é o caso para o miR-146a-3p.

A ocorrência de SNPs em pre-miRNAs é relativamente rara, sendo que somente 10% de todos os pre-miRNAs tem SNPs documentados, e menos de 1% dos miRNAs apresentam SNPs localizados na sua região *seed* (SAUNDERS; LIANG; LI, 2007). Acredita-se que estas regiões *seed* estão sujeitas a uma seleção purificadora já que cada miRNA age regulando centenas de alvos diferentes sendo reguladores de diversas vias de grande importância biológica (SAUNDERS; LIANG; LI, 2007).

Liu e colaboradores identificaram em 2012 1.940 SNPs em regiões do genoma humano que codificam pre-miRNAs e 414.510 SNPs relacionados a miRNAs que podem estar influenciando a interação de miRNAs e seus mRNAs alvo, por exemplo, causando a perda ou a criação de novos sítios de ligação de miRNAs.

## 2.7 SNPS EM microRNAs ASSOCIADOS AO CÂNCER

Existe uma forte relação entre as alterações de miRNAs, sejam elas mudanças estruturais ou quantitativas de miRNAs maduros, e o risco de

desenvolvimento de câncer, inclusive, a perda ou o ganho de funções de miRNAs específicos são eventos chave no desenvolvimento do câncer de mama (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006).

Os primeiros miRNAs a serem relacionados com o câncer foram o miR-15a e o miR-16-1, sendo que uma redução nos seus níveis de expressão foi observada na maioria dos pacientes de leucemia linfóide crônica de células B (LLC-B) (CALIN *et al.*, 2002). A deleção da região cromossômica 13q14, onde estão localizados seus genes, está presente em mais da metade dos pacientes de LLC-B (DÖHNER *et al.*, 2000). Estudos seguintes revelaram que em alguns casos de LLC-B há um mecanismo alternativo a essa deleção capaz de reduzir muito os níveis de miR-16-1, descrito como uma mutação germinativa C>T localizada na região *downstream* do grampo do miR-16-1 (CALIN *et al.*, 2005). Somente em 2013, no estudo de Auyeung *et al.* foi reportada uma explicação para este fenômeno, quando foi observado que para o processamento e maturação da maioria dos miRNAs em células humanas é necessária a presença de um sítio de reconhecimento para o fator de *splicing* SRp20 em região *downstream* em relação ao grampo dos pri-miRNAs. A mutação germinativa descrita por Calin *et al.* causa a ruptura do sítio de reconhecimento da SRp20 e dessa forma reduz o processamento e consequentemente a expressão do miR-16-1, levando ao desenvolvimento da LLC-B.

Desde a sua descoberta, polimorfismos em genes de miRNAs vêm sendo descritos como importantes fatores no desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Como a expressão de miRNAs tende a ser tecido específica e a ser específica de algumas patologias, alterações na sequência dos miRNAs podem predispor ao desenvolvimento de câncer em órgãos específicos e mediar diferentes alterações moleculares nos diferentes tecidos (WOJCICKA; DE LA CHAPELLE; JAZDZEWSKI, 2014).

## 2.8 SNPS EM microRNAs ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA

Diversos estudos reportam o impacto de diferentes polimorfismos em genes de miRNAs, localizados na região do pri-miRNA, pré-miRNA ou na região que dará origem a região *seed* no risco de desenvolvimento do câncer de mama.

Um exemplo seria o miR-196a2 rs11614913:T>C, que foi encontrado em vários estudos associado significativamente com a variante CC em homozigose aumentando o risco de desenvolvimento de câncer de mama. O miR-196a-C leva à redução da expressão de dois genes supressores de tumor, o *GADD45G*, que regula a proliferação celular e o *INHBB* que é um regulador negativo do crescimento celular. Este resultado já foi observado em populações de origem europeia, chinesa e da Arábia Saudita (HOFFMAN *et al.*, 2009; HU, *et al.*, 2009; ALSHATWI *et al.*, 2012).

Outro exemplo seria o miR-499 rs3746444:A>G, responsável por causar mau pareamento na estrutura de grampo do pre-miR-499 ocasionando uma mudança de A:U para um par G:U, e descrito como fator de risco para o câncer de mama (HU *et al.*, 2009; ALSHATWI *et al.*, 2012; WANG, YANG e REN, 2012). Foi levantada a hipótese de que o polimorfismo rs3746444 tem efeito diferente em diferentes populações, tendo sido descrito como fator de risco em populações asiáticas (HU *et al.*, 2009; WANG, YANG e REN, 2012; HE *et al.*, 2015), iraniana (OMRANI *et al.*, 2014) e da Arábia Saudita (ALSHATWI *et al.*, 2012) e não mostrando alterações significativas em populações de origem europeia (WANG, YANG e REN, 2012).

O polimorfismo rs895819:A>G no miR-27a foi associado com redução no risco de câncer de mama. Este SNP está localizado na alça do pri-miR-27a e segundo previsões calculadas no programa *RNAfold* (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/>) por Yang *et al.* (2010) não afetaria sua conformação e nem seu  $\Delta G$ . Foi sugerido por Zeng, Yi e Cullen, (2005) que a Drosha cliva preferencialmente pri-miRNAs com grampo terminal longo, e a previsão de Yang demonstrou que o polimorfismo rs895819 está no centro do grampo terminal, provavelmente levando à redução do tamanho do mesmo. Consequentemente, isto bloquearia a ação de clivagem da Drosha e reduziria o processamento do pri-miR-27a em pre-miRNA e miRNA maduro. O miR-27a atua como um gene supressor de tumor tendo como alvo genes promotores de crescimento e que contribuem com a angiogênese como *CASP8*, *MLH1*, *VEGFC*, *BAX*. Estudos de meta-análise reforçam esse achado, mostrando associação deste SNP com risco reduzido de desenvolvimento de câncer de mama em algumas populações (ZOU *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013).

No polimorfismo miR-608 rs4919510:C>G, localizado no miRNA maduro, os genótipos CG e GG foram associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama do subtipo HER2 positivo (HUANG *et al.*, 2012). Um dos alvos previstos do miR-608 é o mRNA do gene *HSF1* que desempenha papel chave na tumorigênese induzida por HER2. Realmente, ao calcular o  $\Delta G$  da ligação do miR-608 (alelo C) e do miR-608 (alelo G) com o mRNA *HSF1*, Huang e colaboradores (2012) observaram que a variante G apresenta menor afinidade pelo mRNA *HSF1*.

No miR-125a o polimorfismo rs12975333:G>T é responsável por causar uma troca numa posição correspondente à posição 8 do miRNA maduro e reduz drasticamente os níveis de processamento do pri-miRNA em pre-miRNA. Consequentemente, leva a uma redução drástica na quantidade de miRNA maduro, levando a uma superexpressão do seu gene alvo, o gene *HER2* (DUAN; PAK; JIN, 2007). O polimorfismo rs12975333 está associado com um risco significativamente mais alto de desenvolvimento de câncer de mama na população belga da Antuérpia (LI *et al.*, 2009).

Todos estes estudos, reforçam a hipótese de que um polimorfismo de um único nucleotídeo que resulte no rompimento do pareamento de bases, principalmente dentro da estrutura em forma de grampo de um miRNA, é capaz de prejudicar o seu processamento e leva à desregulação dos níveis de miRNA maduro.

## 2.9 MIR-146A

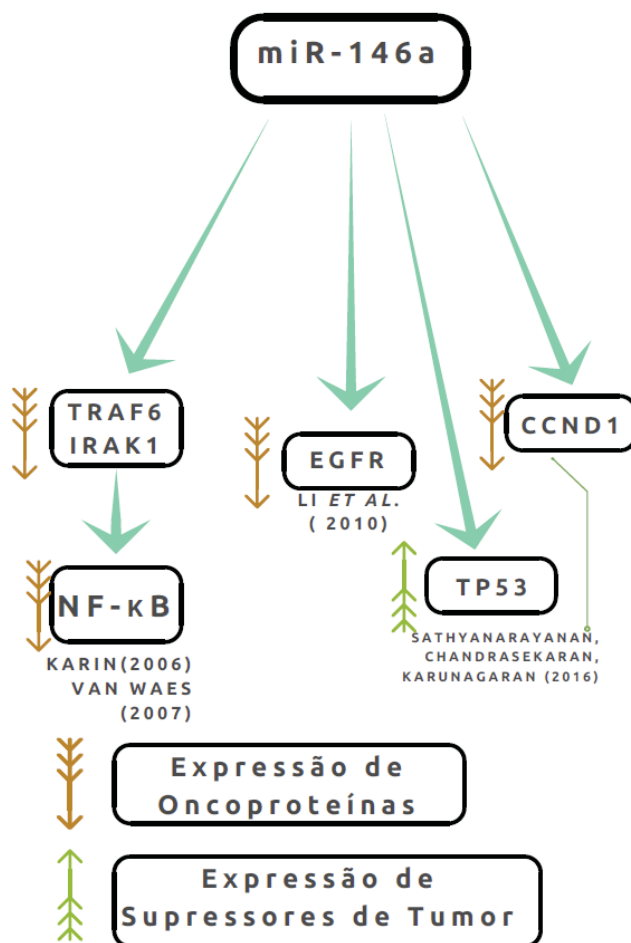
O gene *MIR146A*, que codifica o miR-146a, está localizado na região cromossômica 5q33.3. Os miRNAs maduros são produzidos a partir de ambos os braços do pre-miR-146a formando produtos estáveis e detectáveis, os miR-146a-5p e miR-146a-3p.

Os miRNAs que são transcritos em pares de produtos estáveis 5p/3p muitas vezes são encontrados sendo coexpressos nos tecidos humanos e no câncer isto também é observado. Um estudo de 2014 de câncer de colón encontrou 19 pares de miRNAs desregulados que estavam sendo coexpressos (CHOO *et al.*, 2014). Muitos destes miRNAs encontrados já haviam sido

descritos antes, porém sem ter sido identificado de qual miRNA, 3p ou 5p, se tratava. Este é um problema encontrado também nos estudos do miR-146a, a maioria dos autores não especifica com qual produto trabalhou. O estudo de Choo e colaboradores mostrou também que alguns pares 5p/3p apresentam como alvo o mesmo transcrito ou apresentam como alvo diferentes transcritos de uma mesma via.

Entre os mRNAs alvos previstos para o miR-146a estão produtos de genes reconhecidamente envolvidos na carcinogênese, como os envolvidos em vias de adesão focal, fator de crescimento epidérmico, via RAS, receptor tirosina quinase (como o *ERBB*), interleucinas, receptores do tipo Toll, fator de crescimento nervoso (*NGF*), vias de angiogênese e genes da via p53 (Resumidos na FIGURA 10).

FIGURA 10 - RESUMO DOS ALVOS DO MIR-146A



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: Exemplos de produtos proteicos regulados pelo miR-146a. As setas em marrom indicam redução nos níveis proteicos enquanto que as setas verdes indicam aumento nos níveis de produto. Os artigos que já descreveram este efeito estão citados abaixo de cada proteína.

O estudo de Bhaumik *et al.* de 2008, mostrou que o miR-146a reduz os níveis de IRAK1 e TRAF6, componentes essenciais das vias de sinalização *Toll-like* e IL-1 que ativam NF- $\kappa$ B. Eles comprovaram, que a introdução do miR-146a reduz somente a quantidade de proteína expressa, ou seja, reduz a expressão ao nível de tradução, e não reduz os níveis de mRNA produzidos. Como consequência dessa redução, não ocorre a ativação da NF- $\kappa$ B, reduzindo sua capacidade de aumentar a sobrevivência e o potencial metastático de células de câncer (KARIN, 2006; VAN WAES, 2007).

Li e colaboradores reportaram em seu estudo com cultivo de células que há uma expressão reduzida de miR-146a nas células de câncer de pâncreas em comparação com células normais do epitélio ductal do pâncreas. Eles observaram, através de experimentos de re-expressão gênica, que o miR-146a é capaz de inibir a capacidade de invasão das células de câncer de pâncreas ao levar à redução nos níveis de EGFR e de IRAK1 (LI *et al.*, 2010).

Em um estudo com pacientes e linhagens de células de câncer cervical e colorretal observou-se que o miR-146a reduz a expressão de CTNNB1 (da via de sinalização Wnt), STAT3 (da via de sinalização JAK/STAT) e RELA (também da via de sinalização do NF- $\kappa$ B); e que aumenta a expressão das proteínas supressoras de tumor p53 e CDH1, cuja perda de função está associada ao aumento proliferativo, invasivo e surgimento de metástases (SATHYANARAYANAN; CHANDRASEKARAN; KARUNAGARAN, 2016). Além disso, os níveis de expressão da proteína CCND1, importante reguladora do ciclo celular, e da SNAI1, uma reguladora da transição epitélio-mesenquimal, foram também reduzidos pela reintrodução do miR-146a em células previamente silenciadas no estudo de Sathyanarayanan e colaboradores.

Uma redução nos processos celulares de crescimento e indução de apoptose pelo miR-146a foi observada também em glioma, onde se observou que o miR-146a tem como alvo o mRNA de *NOTCH1* (MEI; BACHOO; ZHANG, 2011). Em cinco linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas foi observado que o miR-146a induziu a apoptose, suprimiu o crescimento celular, inibiu a capacidade de migração e inibiu a sinalização *downstream* de EGFR (CHEN *et al.*, 2013). Em câncer gástrico o grupo de Hou e colaboradores (2012) observou que 84% dos pacientes analisados apresentaram expressão reduzida de miR-146a, e observaram que os pacientes

com alta expressão de miR-146a apresentaram maior sobrevida global quando comparados aos pacientes com baixa expressão. Outro alvo do miR-146a é o mRNA de *NOS1*, que foi identificado em estudos *in silico* e testado em ensaios de luciferase, evidenciando que o miR-146a pode também desempenhar um papel importante no desenvolvimento de hiperresponsividade bronquial em resposta a intubação durante anestesia geral (LUAN *et al.*, 2016).

Em um estudo que analisou a expressão de miR-146a-3p no câncer de bexiga, foi observado que o mesmo tem a capacidade de reduzir a migração e invasão e induzir a parada do ciclo celular e senescência de células de câncer de bexiga (XIANG *et al.*, 2017). Observou-se que isto ocorre porque o miR-146a-3p tem como alvo o mRNA do oncogene *PTTG1* (*Pituitary tumor-transforming gene 1*), observou-se também que o miR-146a-3p é pouco expresso em células e tecido de câncer de bexiga.

Em pacientes com câncer de mama do subtipo triplo-negativo em relação a pacientes não triplo-negativos, o miR-146a apresentou expressão aumentada, em análise realizada utilizando-se o método *Nanostring* (SUGITA *et al.*, 2016). No artigo de M'Hamed *et al.* (2015) destacou-se que, por ter o *BRCA1* como alvo previsto, o miR-146a pode estar envolvido no desenvolvimento do câncer de mama triplo negativo. Além disto, o miR-146a pode também agir como fator de risco ao reduzir a apoptose em células do subtipo basal com *P53* mutado (SANDHU *et al.*, 2014).

## 2.10 miR-146A E O POLIMORFISMO rs2910164

O SNP rs2910164 (G>C) está localizado na posição +60 em relação ao primeiro nucleotídeo do pre-miR-146a (JAZDZEWSKI *et al.*, 2008), posicionando-o assim, no miR-146a-3p. Essa mudança de um nucleotídeo G para C no braço 3p do pre-miR-146a resulta em um mau pareamento na região de grampo desse precursor mudando de G:U para C:U, alterando o  $\Delta G$  previsto de -42.4 kcal/mol para -39.6 kcal/mol (HU *et al.*, 2008) (FIGURA 11). O alelo *MIR146A*, que contém citosina (alelo C) na posição +60, apresenta menor eficiência no processamento do pri-miR-146a no núcleo do que o alelo que contém guanina (alelo G), consequentemente isso gera níveis mais baixos de

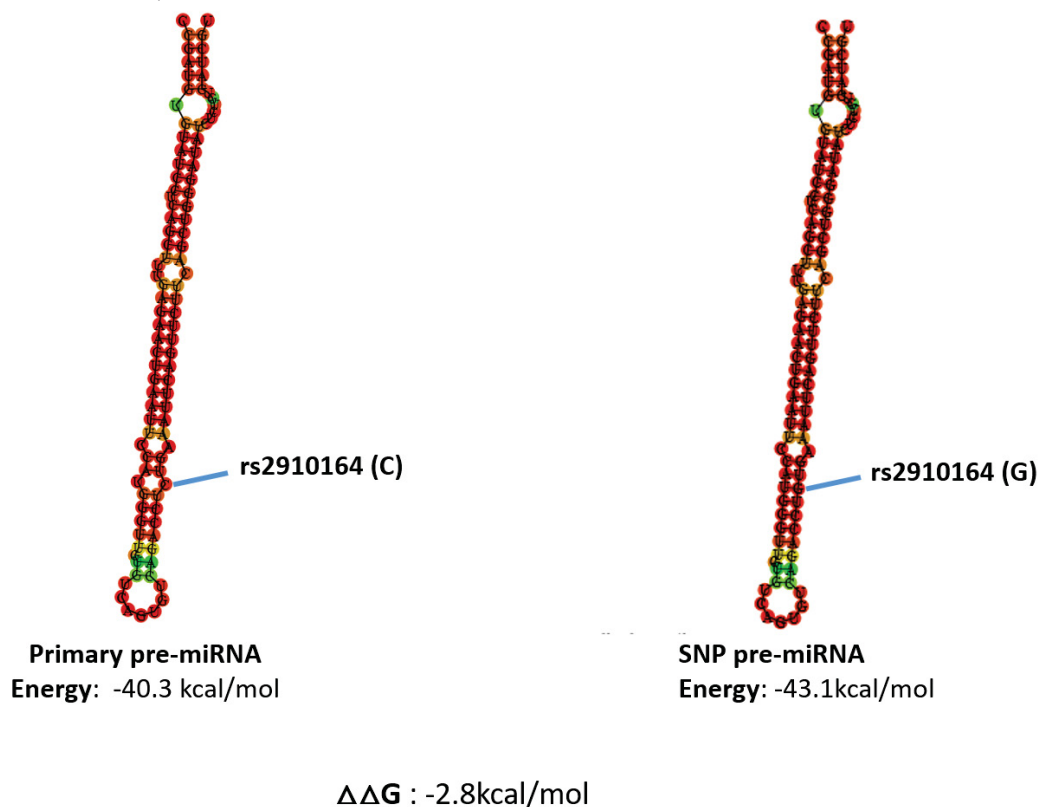


pre-miR-146a-C e níveis mais baixos de miR-146a maduro (JAZDZEWSKI *et al.*, 2008). O alelo G produz duas vezes mais miR-146a maduro do que o alelo C, sendo que a quantidade de pre-miRNA e de miRNA maduro foi respectivamente de 1,9 e 1,8 vezes mais baixa no alelo C do que no alelo G, e essa redução na expressão pôde ser revertida ao se mutar o C de volta para G. Como a razão entre pre-miRNA e miRNA maduro se encontrava inalterada para ambos os alelos, Jazdzewski e colaboradores descartaram a hipótese de que a alteração nos níveis de produção de miRNA maduro estivesse acontecendo no processamento pela Dicer. Devido a esta observação, avaliaram a eficiência de processamento do pri-miRNA no núcleo e a ligação das proteínas transportadoras ao pre-miRNA e então observaram que ambos os processos são afetados pelo polimorfismo. Essa redução do nível de miR-146a reduz a inibição de genes alvo incluindo aqueles envolvidos na via de sinalização das citocinas e dos receptores do tipo Toll (*TRAF6*, *IRAK1* e *CCDC6*) (JAZDZEWSKI *et al.*, 2008), além do gene *NF-κB*, que está diretamente relacionado com o potencial invasivo do câncer de mama (BHAUMIK *et al.*, 2008).

Além disso, o polimorfismo rs2910164 altera os mRNA alvo do miR-146a-3p sendo que as suas isoformas apresentam apenas poucos alvos em comum como foi descrito por JAZDZEWSKI *et al.* (2009). Neste estudo Jazdzewski e colaboradores utilizaram a ferramenta online TargetRank para prever quais seriam os alvos do miR-146a-3p-G e do miR-146a-3p-C.



FIGURA 11 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO miR-146A E POLIMORFISMO RS2910164



FONTE: A Autora (2017).

LEGENDA: Imagem gerada no programa online *RNAfold WebServer*, disponível em: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>. Valores de  $\Delta G$  e da diferença entre os dois  $\Delta G$ , o  $\Delta\Delta G$ , calculados no programa online *miRNASNP V2* disponível em: [http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/miRNA\\_details.php?id=hsa-mir-146a](http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/miRNA_details.php?id=hsa-mir-146a).

Por mais que a variação de G para C no precursor de miR-146a cause mau pareamento na sua região de grampo, estudos mostram que o miR-146a-C apresenta uma maior estabilidade e maior afinidade de ligação pela região 3' UTR do mRNA do gene *BRCA1*, importante supressor de tumor, quando comparado com o alelo G. Isso resulta em uma maior eficiência em se ligar ao mRNA de *BRCA1* e degradá-lo, o que talvez explique a habilidade da variante alélica C, reportada por PASTRELLO *et al.* (2010) e SHEN *et al.* (2008), de promover câncer de mama hereditário em uma idade precoce, dado ainda controverso na literatura já que alguns estudos não encontraram os mesmos resultados (CATUCCI *et al.*, 2010).

Atualmente, já foram realizados diversos estudos relacionando o rs2910164 com o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Em uma meta-

análise de seis estudos do tipo caso-controle, que incluiu 4238 casos de câncer de mama e 4469 controles livres da doença, o polimorfismo rs2910164 foi associado com risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama no genótipo homozigoto CC, comparado com genótipo CG/GG, porém somente em europeus, não apresentando o mesmo efeito na amostra de população asiática chinesa (LIAN; WANG; ZHANG, 2012). Resultado semelhante foi também observado na meta-análise de Dai *et al.* (2015) em que se analisou 8 estudos, 5 dos quais se sobrepõem à meta-análise de Lian, Wang e Zhang (2012), eles associaram um aumento no risco de câncer de mama com o rs2910164 em europeus ao analisar o modelo genético dominante (CC/CG vs. GG) e o modelo de comparação entre homozigotos, para os indivíduos de origem asiática e chinesa o rs2910164 não se apresentou associado ao risco. Na meta-análise de Ma *et al.* (2013) em que analisaram vários tipos de câncer em relação ao rs2910164 e outros quatro SNPs (utilizaram dados de genotipagem do rs2910164 de 47 estudos totalizando 22.055 pacientes de câncer e 29.138 controles), foi observado que o alelo C do rs2910164, em populações europeias, representa um fator de risco para desenvolvimento de câncer, incluindo câncer de mama, enquanto que em populações asiáticas o alelo C se encontra relacionado a um risco reduzido de desenvolvimento de câncer, evidenciando assim a divergência no comportamento deste polimorfismo nestes dois grupos étnicos, é importante ressaltar que esta meta-análise incluiu os seis estudos utilizados na meta-análise de Lian, Wang e Zhang (2012) citada anteriormente. Trabalhando com uma amostra de população australiana Upadhyaya *et al.* (2015), por sua vez, encontraram que o alelo G do rs2910164 está associado ao risco aumentado de desenvolvimento do câncer de mama.

A frequência do SNP rs2910164 na população global é, segundo o site do projeto *HapMap*, *1000 Genomes* e do projeto de Sequenciamento Humano *NHLBI*, variável entre as diversas populações estudadas (QUADRO 1).

QUADRO 1- FREQUÊNCIA DO SNP RS2910164 NAS DIFERENTES POPULAÇÕES

População	Frequência Alélica	
TSI	C: 0.26	G: 0.74
CEU	C: 0.24	G: 0.76
NHLBI E_A	C: 0.23	G: 0.77
NHLBI A_A	C: 0.39	G: 0.61
ASW	C: 0.40	G: 0.60
YRI	C: 0.50	G: 0.50
CHB	C: 0.65	G: 0.35
CHD	C: 0.60	G: 0.40
JPT	C: 0.61	G: 0.39

FONTE: Adaptado de dados do projeto *HapMap* (2017).

LEGENDA: População italiana da Toscana (TSI); População americana de residentes de Utah com descendência europeia (CEU); População americana do sudoeste com origem africana (ASW); População Yoruba em Ibadan, Nigéria (YRI); População Han Chinesa de Beijing (CHB); População de Chineses de Denver, Colorado (CHD); População de japoneses de Tóquio (JPT). Do Projeto de Sequenciamento Humano NHLBI que analisou este SNP em indivíduos americanos com ancestralidade Europeia (NHLBI E\_A) e em americanos com ancestralidade africana (NHLBI A\_A).

É importante considerar que populações com diferentes ancestralidades podem ter variações nas distribuições alélicas, que resultarão em uma diferente interação com os efeitos ambientais (UPADHYAYA *et al.*, 2015). Sendo assim, estudos de meta-análise mostram que a associação entre o polimorfismo rs2910164 e o câncer depende da população estudada (WANG, A. *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013), seja pelo *background* genético das populações ou devido aos variados mecanismos carcinogênicos e exposição a carcinógenos. Outra possibilidade é que o polimorfismo sendo testado não seja a variante causal, mas esteja em desequilíbrio de ligação com a verdadeira variante causal (HIRSCHHORN *et al.*, 2002; MA *et al.*, 2013).

Além disso, diversos estudos sugerem que a associação entre o polimorfismo rs2910164 do miR-146a e a suscetibilidade ao câncer depende do tipo de câncer estudado, isso porque diferentes tipos de câncer apresentam patogêneses distintas (HU *et al.*, 2014). Por exemplo, os níveis de miR-146a já foram descritos como aumentados em estudos de carcinoma papilar da tireoide e em estudos de câncer cervical em relação a amostras não tumorais, enquanto que nos estudos de câncer de próstata o nível de miR-146a encontra-se reduzido nas amostras tumorais em relação às amostras normais (WANG, A. *et al.*, 2012). Alguns estudos associam este polimorfismo também ao glioma (PERMUTH-

WEY *et al.*, 2011), câncer de bexiga (WANG, M. *et al.*, 2012), de próstata (XU *et al.*, 2010) e carcinoma hepatocelular (XU *et al.*, 2008).

O polimorfismo rs2910164 localizado no miR-146a-3p contribui para o câncer de tireoide (JAZDZEWSKI *et al.*, 2009), sendo o genótipo CC associado com maiores taxas de mortalidade em pacientes com carcinoma papilar da tireoide do tipo folicular (KOTLAREK *et al.*, 2018). No câncer de pulmão, em um grupo de mulheres não fumantes, por sua vez, observou-se que o genótipo GC está relacionado a um menor risco enquanto que o genótipo CC está relacionado a um maior risco de desenvolvimento de câncer, observou-se neste estudo que o miR-146a-3p-C se liga menos ao mRNA do gene *TRAF6* (gene que atua como oncogene em câncer de pulmão) (YIN *et al.*, 2017).

### 3 JUSTIFICATIVA

A identificação de SNPs que afetem a função gênica ou a expressão gênica de miRNAs e contribuam na suscetibilidade ao câncer de mama é importante para auxiliar na predição de riscos individuais e populacionais e para o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento do câncer de mama. O presente estudo pretende contribuir na identificação de marcadores moleculares de risco e prognóstico, além de contribuir para um melhor entendimento da biologia do câncer de mama. O polimorfismo rs2910164, apesar de já ter sido avaliado em estudos de associação com o câncer de mama em outras populações, ainda não foi estudado na população brasileira. O estudo da associação deste polimorfismo com o câncer de mama e as frequências alélicas descritas neste estudo para a amostra de população brasileira podem auxiliar no melhor entendimento do envolvimento dos SNPs de miRNAs no câncer de mama em nossa população. Ainda, decidimos complementar realizando análises *in silico* utilizando o banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), obtendo dados sobre a expressão relativa do miR-146a no câncer de mama e realizando comparações entre os subtipos moleculares.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a distribuição e se há associação do SNP rs2910164, localizado na região *seed* do miR-146a, com o risco de desenvolvimento de câncer de mama em uma amostra da população brasileira.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se há associação entre o polimorfismo rs2910164, localizado na região *seed* do miR-146a, e a suscetibilidade ao câncer de mama;
- Verificar se há associação entre o polimorfismo rs2910164 e os parâmetros clínicos e histopatológicos do câncer de mama;
- Realizar análise *in silico* para verificar os níveis de expressão do *MIR146A* no Banco de Dados TCGA em relação aos subtipos moleculares.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de carcinoma ductal invasivo foram coletadas durante o procedimento cirúrgico no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba, Paraná. Todo material biológico utilizado foi obtido após assinatura do consentimento livre e esclarecido pelas pacientes. O projeto de pesquisa sob o título "ASPECTOS GENÉTICOS DA SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Santa Cruz (CEP/UESC), sob o número de registro na Plataforma Brasil (CAAE) 67400917.3.0000.5526.

Foram utilizadas amostras de 326 mulheres portadoras de câncer de mama, provenientes de uma amostra representativa da população brasileira da cidade de Curitiba, PR, com idade média de  $56,23 \pm 15,00$  anos. A população de Curitiba é uma população brasileira, miscigenada e tem em sua maioria ancestralidade europeia (PROBST *et al.*, 2000). Destas amostras, o material utilizado foi obtido a partir de tecido tumoral fresco conservado no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e sangue coletado em tubos para Coleta à Vácuo (EDTA) BD Vacutainer®. Como controle foi utilizada uma amostra de 411 mulheres consideradas saudáveis do banco de doadores de medula óssea do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da UFPR de Curitiba, PR, com idade média de  $47,66 \pm 4,69$ .

Todas as amostras tumorais foram processadas no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR para a remoção de tecido estromal, tecido adiposo e vasos sanguíneos. As amostras estão caracterizadas de acordo com: idade das pacientes, características histopatológicas e características imunoistoquímicas. As informações sobre os parâmetros clínicos e histopatológicos foram obtidas a partir dos laudos anatomopatológicos e o número de informações é variável entre as pacientes (APENDICE 1).

As informações clínico-patológicas estão sumarizadas na TABELA 2. Dentro do grupo de pacientes o tipo histológico mais comum foi o carcinoma ductal invasor com 75% ( $n=233$ ), seguido por carcinoma lobular invasor 9%

(n=28), carcinoma ductal *in situ* 4% (n=12) e o carcinoma mucinoso invasor 3% (n=9), seguido por outros tipos histológicos menos frequentes. Foi possível estabelecer a classificação imunoistoquímica de 208 pacientes que tinham disponibilidade das informações necessárias nos laudos e a distribuição nos subtipos foi de luminal A 40% (n=84), luminal B 38% (n=78), HER2+ 7% (n=15) e triplo negativo 15% (n=31). Em relação ao grau de diferenciação tumoral observou-se que 32% das pacientes apresentam grau de diferenciação III, 53% apresentam grau de diferenciação moderado II e 16% apresentam grau I. Quanto à presença ou ausência de invasão de linfonodos regionais aproximadamente metade das pacientes apresentou invasão (47%).

TABELA 2 - DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PACIENTES COM CÂNCER

<b>Casos de Câncer de Mama n=326</b>					
Histologia	%	n	Grau Tumoral	%	n
Ductal Invasor	75%	233	Grau I	16%	37
Lobular Invasor	9%	28	Grau II	53%	125
Ductal <i>in situ</i>	4%	12	Grau III	32%	75
Mucinoso Invasor	3%	9	Sem informação	-	89
Outros	9%	28			
Sem informação	-	16			
Subtipo Imunoistoquímico	%	n	Invasão de Linfonodos Regionais	%	n
Luminal A	40%	84	Presença	47%	116
Luminal B	38%	78	Ausência	53%	133
HER2+	7%	15	Sem informação	-	77
Triplo Negativo	15%	31			
Sem informação	-	118			

Fonte: a Autora (2018).

## 5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA de tumores sólidos utilizou-se o método por fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico. Neste método, fragmentos de amostras de tumor são homogeneizados no *vórtex* em 160 µL de tampão de proteinase K e



40 µL de proteinase K (10 mg/mL). A mistura permanece incubada em banho-maria a 56°C por 24 horas. Em seguida, incubam-se as amostras em banho seco a 95 °C por 10 minutos para a inativação da proteinase K. Posteriormente adiciona-se um volume de fenol:clorofórmio:álcool-iso-amílico a 25:24:1 v/v, e é realizada a homogeneização no *vórtex* por 15 segundos e centrifugação a 17.562 g por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante é transferido para um novo tubo (esta etapa é realizada duas vezes). São adicionados dois volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5 M para precipitação do DNA, a solução é então mantida no freezer -20°C por 24 horas. Centrifuga-se os tubos a 17.562 g por 15 minutos e descarta-se o sobrenadante, realiza-se a adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugação a 17.562 g por 5 minutos. O sobrenadante é então descartado e o DNA ressuspenso em 40 µL de água ultrapura, depois medimos sua concentração no espectrofotômetro NanoDrop™ e diluímos para a concentração de 25ng/µL que pode ser utilizada nas PCRs.

Para a extração de DNA de sangue periférico utilizou-se o método de *Salting out*. Neste método as amostras de sangue são centrifugadas, em tubos do tipo Falcon de 15 mL com tampão de lise para células vermelhas (eritrócitos), RCLB, a 908 g por 10 minutos. O sobrenadante é então descartado e se ressuspende o *pellet* formado em 12mL de RCLB novamente, repetindo-se esta etapa 4 vezes. Na última centrifugação adiciona-se 4 gotas de PBS para se ressuspender o *pellet*, centrifuga-se a suspensão em tubo de 1,5 mL por 4 minutos a 20.817 g. O sobrenadante é então descartado e prossegue-se com o botão de glóbulos brancos, adiciona-se 80 µL de tampão de proteinase K, 40 µL de proteinase K (10mg/mL), 20 µL de SDS 20% e 240 µL de água ultrapura. Esta solução permanece incubada por 24 horas em banho-maria a 56°C. Após estas 24 horas a proteinase K é inativada (permanecendo por 5 minutos a 95°C no banho seco) e adiciona-se 100 µL de solução saturada de NaCl (5M). Após homogeneização, centrifuga-se os tubos por 2 minutos a 10.621 g e transfere-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL, repetindo-se esse passo mais uma vez. Após transferir-se o sobrenadante pela segunda vez, acrescenta-se 1 mL de etanol absoluto e verte-se o tubo algumas vezes, centrifugando-se os tubos posteriormente por 2 minutos a 10.621 g e desprezando-se o sobrenadante. Adiciona-se 1 mL de etanol 70%, centrifuga-se novamente os tubos por 2 minutos a 10.621 g e descarta-se o sobrenadante. Depois de seco,

o DNA é ressuspendido em 40 µL de água ultrapura e a sua concentração é medida no equipamento NanoDrop™ para depois ser diluído para a concentração de 25ng/µL e ser utilizado nas PCRs.

### 5.3 SELEÇÃO DE SNPS

Para verificar quais SNPs estão em região *seed* de miRNAs, foi utilizado o banco de dados *Polymir*s (BHATTACHARYA; ZIEBARTH; CUI, 2014). No total foram encontrados 196 SNPs em *seeds* de 175 miRNAs (alguns miRNA contêm mais de um SNP).

Com o objetivo de identificar SNPs de importância no contexto dos carcinomas mamários, para o presente estudo selecionamos 16 SNPs de regiões *seed* de miRNA cujo alelo de menor frequência populacional (MAF) apresentasse frequência acima de 5% na população geral de acordo com o banco de dados dbSNP. Destes 16 SNPs identificados com MAF acima de 5% selecionamos o rs2910164 (MAF 0.27), que está localizado na região *seed* do miR-146a. Esta seleção baseou-se em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, em que este miRNA estava com expressão aumentada em pacientes portadores de câncer de mama triplo-negativo em relação a pacientes não triplo negativos, em análise realizada utilizando-se o método *Nanostring* (SUGITA *et al.*, 2016). Nesse estudo foi feita a análise de tumores de pacientes americanas brancas não hispânicas, nas quais o miR-146a apresentou expressão aumentada em portadoras de câncer de mama triplo-negativo.

### 5.4 GENOTIPAGEM POR PCR-SSP

Após a extração de DNA das amostras, foi realizada a amplificação das regiões específicas do polimorfismo rs2910164 por PCR com *primer* de sequência-específica (PCR-SSP). Na PCR-SSP, os oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*) *forward* ou *reverse* são projetados com 18 a 22 nucleotídeos para se ligarem a alelos únicos ou grupos de alelos possibilitando a detecção de uma mutação ou polimorfismo escolhido. Assim, em condições

adequadas de PCR, os pares de *primers* com ligação completa ou quase completa são favoráveis à amplificação, ou seja, geram um resultado positivo, enquanto que os pares de *primers* que não conseguem se ligar não permitem amplificação da amostra, gerando um resultado negativo. A sequência dos *primers* utilizados neste estudo pode ser encontrada no QUADRO 2 abaixo.

QUADRO 2 - SEQUENCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO

Primer	Sequência	Produto de PCR
Forward GALC	TTACCCAGAGCCCTATCGTTCT	352 pb
Reverse GALC	GTCTGCCCATCACCACCTATT	
Forward rs2910164_C	GGTTGTGTCAGTGTGTCAGACCT <b>C</b>	196 pb
Reverse rs2910164	GAGCCTGAGACTCTGCCTTCT	
Forward rs2910164_G	GGTTGTGTCAGTGTGTCAGACCT <b>G</b>	196 pb
Reverse rs2910164	GAGCCTGAGACTCTGCCTTCT	

FONTE: a Autora (2017).

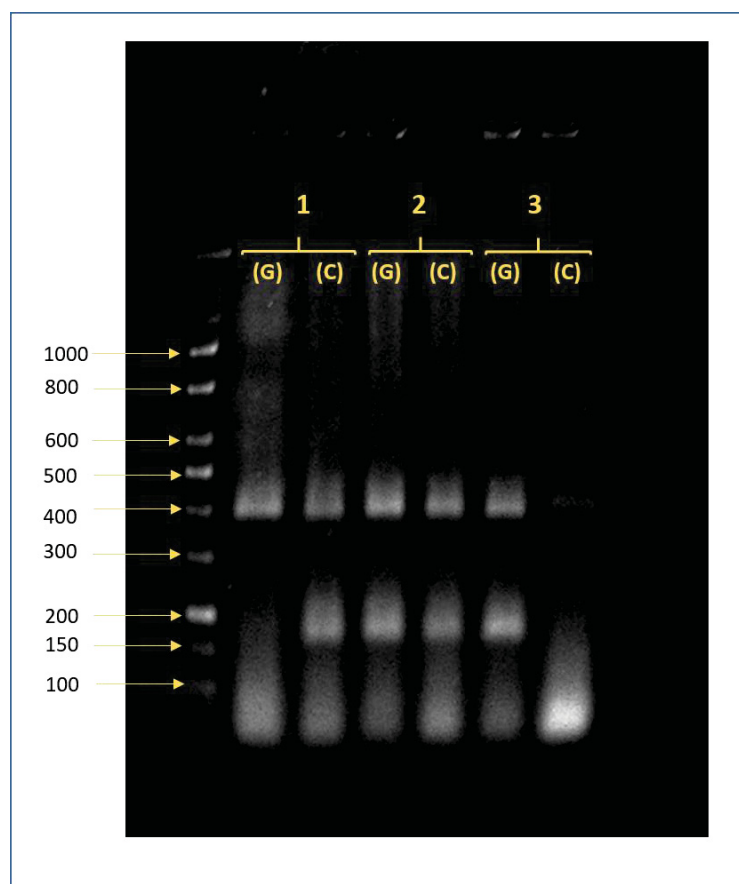
LEGENDA: Tamanho dos Produtos de PCR em pares de base (pb).

As PCRs foram realizadas a partir de 20 a 80 ng de DNA genômico e 0,1 a 0,3  $\mu$ M de cada iniciador específico na presença de 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM e 0,5 a 2 unidades de Taq polimerase. Após o preparo das amostras, estas foram submetidas à PCR em termociclador para processos de desnaturação das cadeias de DNA, acoplamento dos *primers* e extensão por alongamento da cadeia pela Taq polimerase, sob as seguintes condições de ciclagem: 95°C (período de desnaturação) por 30 segundos, seguido por 30 segundos na temperatura de acoplamento ideal dos *primers* desenhados (59°C), terminando com 72°C (período de extensão) por 30 segundos, ao todo foram realizados 35 ciclos. Cada reação foi acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA. Após a PCR, os fragmentos foram analisados em corrida eletroforética em gel de agarose a 2% corado com GelRed (Biotium).

A genotipagem é rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados (FIGURA 12). Os tamanhos dos produtos de PCR esperados estão representados no QUADRO 2. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de produtos específicos de PCR. Contudo, o processo de PCR pode ser negativamente afetado por diversos fatores como, por exemplo, erros de pipetagem, má qualidade ou baixa

concentração de DNA, presença de inibidores de PCR, precisão do termociclador. Para amenizar estas possíveis interferências foi incluído, nas PCRs, um par de *primers* de controle positivo interno que corresponde a regiões conservadas de um gene, o *GALC*, presente em todas as amostras de DNA a serem utilizadas. Deste modo, os produtos de amplificação gerados podem apresentar três padrões de bandas: aquele das amostras heterozigotas para o polimorfismo com duas bandas, uma do controle positivo interno e a outra do primeiro alelo em uma canaleta. Na outra canaleta, a banda do controle positivo interno e do outro alelo. As homozigotas para um dos dois alelos terão a canaleta do alelo para o qual é homozigota com duas bandas, a banda do controle positivo e a banda do alelo, e na outra canaleta só se observará uma banda, o controle positivo interno; e o outro homozigoto seguirá a mesma lógica (FIGURA 12).

FIGURA 12 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS



FONTE: a Autora (2018).

LEGENDA: PCR realizada com o par de *primers* GALC e com os dois conjuntos de pares de *primers* para genotipagem do rs2910164. O tamanho dos fragmentos do marcador está identificado no lado esquerdo da imagem em pares de bases. 1- corresponde a um indivíduo

homozigoto CC, observa-se que ele apresenta o produto de GALC de 352 pb nos dois poços, porém só no poço (C) observamos o produto de 196 pb. 2- corresponde a um indivíduo heterozigoto GC, observa-se que ele apresenta produto tanto do GALC quanto o de 196 pb nos dois poços (G e C). 3 – corresponde a um indivíduo homozigoto GG, observa-se que somente o poço (G) apresenta além de GALC o produto de 196 pb.

Para testar o funcionamento, a qualidade da genotipagem por PCR-SSP e a especificidade dos *primers Forward* rs2910164\_C, *Reverse* rs2910164, *Forward* rs2910164\_G, descritos no QUADRO 2, foi realizado o sequenciamento de seus produtos de PCR. A purificação, a quantificação e o sequenciamento foram realizados pela empresa Myleus Biotecnologia, o sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger. Sequenciou-se os produtos dos *primers Forward* rs2910164\_C + *Reverse* rs2910164 e *Forward* rs2910164\_G + *Reverse* rs2910164 para se verificar o produto em relação a sua sequência, confirmou-se que o produto de 196 pb analisado correspondia à sequência esperada. Foram também sequenciados três produtos de 360 pb de uma região que engloba o SNP para se confirmar a veracidade dos resultados de genotipagem obtidos pelos *primers* do QUADRO 2 (QUADRO 3). As reações de sequenciamento confirmaram que os *primers* desenhados poderiam ser utilizados para a análise de genótipo.

QUADRO 3 - SEQUENCIA DOS PRIMERS PARA GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO

Primer	Sequência	Produto de PCR
Outter Forward	GAGGGGTCTTTGCACCATCTCT	360 pb
Outter Reverse	AACGAGTAGCAGCAGCAGCAAG	

FONTE: a Autora (2017).

LEGENDA: Sequência dos *primers* utilizados para englobar a região do SNP rs2910164. Tamanho do Produto de PCR em pb.

## 5.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE miRNAS NO TCGA

O TCGA é um projeto comunitário iniciado pelo *National Cancer Institute* (NCI) e o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) em 2006. Dentro do TCGA estão disponíveis em uma plataforma *online* gratuita dados provenientes de pesquisas em câncer, contando atualmente com informações de 33 diferentes tipos de tumor, com dados de estudos de larga escala de expressão gênica e de sequenciamento.

Através do TCGA obtivemos acesso a bancos de dados de expressão e de sequenciamento de RNA que foram analisados utilizando-se o pacote *TCGAbiolinks* do R/Bioconductor (COLAPRICO *et al.*, 2016), para se analisar a expressão do miR-146a e para observar se há correlação entre os níveis de expressão de miR-146a e a expressão de BRCA1.

Para nossa análise foram utilizados dados de expressão de 837 pacientes de câncer de mama invasivo e de 105 amostras de tecido não neoplásico adjacente. Pacientes e tecido não neoplásico são provenientes de mulheres autodeclaradas brancas, negras, asiáticas ou com etnia não declarada. Para a análise de expressão do miR-146a por subtipos utilizou-se a classificação em subtipos moleculares intrínsecos, obteve-se informações de expressão de 211 tumores de mama do subtipo Luminal A, 112 Luminal B, 85 Basal e 53 HER2 enriquecido. Para a análise de correlação utilizou-se os dados de expressão das mesmas pacientes com classificação em subtipos moleculares intrínsecos e realizou-se também a análise com dados de pacientes que possuíam classificação imunoistoquímica, totalizando nesta análise 460 tumores luminiais, 29 HER2 positivo e 112 triplo negativo.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por ser um teste particularmente indicado para estudos de caso-controle, foi utilizado o cálculo de *Odds ratio* (OR), uma estimativa do risco relativo (RR), ou seja, uma medida da força da associação entre um fator de risco e o desfecho em um estudo epidemiológico. Foi realizado também o teste de Qui-Quadrado para avaliar se as variáveis (câncer de mama e os diferentes alelos) são ou não independentes e avaliar se os genótipos homozigotos ou heterozigotos estavam distribuídos de maneira diferente em câncer ou controles.

Para se testar se as frequências genotípicas observadas no grupo controle e no grupo de pacientes condiziam com aquelas esperadas em uma população em equilíbrio, foi utilizado o teste de desvios das proporções do teorema de Hardy-Weinberg por Qui-quadrado.

Para as comparações dos parâmetros histopatológicos, subtipo imunoistoquímico, grau de diferenciação do tumor e invasão de linfonodos

regionais entre os grupos de diferentes genótipos das pacientes realizou-se múltiplos teste de Qui-quadrado de Contingência. Para avaliar a diferença na distribuição de idade de diagnóstico entre as pacientes portadoras de alelo de risco e não portadoras realizou-se o teste de Bartlett para analisar se a variância era homogênea entre os grupos para então seguir-se para o teste de análise de variância.

Todas as planilhas foram preparadas em Excel e os testes estatísticos foram realizados com auxílio do *software* R (R CORE TEAM, 2017) com auxílio dos pacotes Nortest e readxl (GROSS; LIGGES, 2015; WICKHAM; BRYAN, 2017). Para todos os testes acima descritos foram considerados como significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

As genotipagens de *MIR146A* foram realizadas em 326 pacientes e 411 controles. As frequências genotípicas do gene *MIR146A* observadas em pacientes e controles, respectivamente, foram de 51% (n=166) e 59% (n=242) de homozigotos G/G; 44% (n=144) e 36% (n=148) de heterozigotos G/C; 5% (n=16) e 5% (n=21) de homozigotos C/C (TABELA 3). A frequência alélica do SNP rs2910164 calculada no grupo de pacientes foi de C:27% e G:73% e no grupo de controles C:23% e G:77% (TABELA 3).

As frequências genotípicas observadas para este gene no grupo controle mostraram-se de acordo com as esperadas pelo teorema de Hardy-Weinberg, indicando que a amostra controle analisada foi retirada de população em equilíbrio (controles:  $\chi^2 = 0,07$ ;  $p > 0,70$ ). As frequências genotípicas observadas para este gene nas pacientes não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que a amostra analisada foi retirada de população que não se apresenta em equilíbrio (pacientes:  $\chi^2 = 4,75$ ;  $p < 0,05$ ).

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE CONTROLES E PACIENTES

<b>Genótipo /Alelo</b>	<b>Controles (n=411)</b>		<b>Pacientes (n=326)</b>	
	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>
GG	59%	242	51%	166
GC	36%	148	44%	144
CC	5%	21	5%	16
Alelo G	77%		73%	
Alelo C	23%		27%	
MAF	0,23		0,27	

Fonte: a Autora (2018).



## 6.2 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

A comparação das frequências obtidas nos dois grupos indicou associação positiva dos genótipos que contêm o alelo C com a suscetibilidade ao câncer de mama, comparamos os genótipos GC/CC com o genótipo mais frequente GG sendo a OR calculada de 1,38 com intervalo de confiança 95% calculado de 1,03 a 1,85 e  $p=0,03$ . As ORs calculadas para os outros modelos se encontram na TABELA 4.

TABELA 4 - ANÁLISE DE OR CONSIDERANDO ALELOS E GENÓTIPOS

Odds Ratio (IC 95%)			
Por Alelo C	CG vs. GG	CC vs. GG	CC/CG vs. GG
1,23 (0,97-1,56)	1,42 (1,05-1,92)	1,11 (0,56-2,19)	1,38 (1,03-1,85)
$p=0,09$	$p=0,02$	$p=0,76$	$p=0,03$

Fonte: a Autora (2018).

O teste do Qui-Quadrado de homogeneidade também foi utilizado para o teste do modelo dominante de alelo de risco C corroborando o resultado do OR com  $\chi^2=4,66$  e  $p<0,05$  (TABELA 5). O teste do Qui-Quadrado de homogeneidade quando utilizado para a comparação dos três diferentes genótipos e a suscetibilidade ao câncer não demonstrou diferença significativa, embora o resultado estivesse próximo ao limite de significância  $\chi^2=5,15$  e  $p<0,10$  (TABELA 5).

TABELA 5 - ANÁLISE POR QUI-QUADRADO DE HOMOGENEIDADE PARA GENÓTIPOS

	GG vs. GC/CC		GG vs. GC vs. CC		
Pacientes	166	160	166	144	16
Controles	242	169	242	148	21
Qui Quadrado	$\chi^2=4,66$ ; $p<0,05$		$\chi^2=5,15$ ; $p<0,10$		

Fonte: a Autora (2018).

### 6.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E IDADE

Os diferentes genótipos foram correlacionados aos parâmetros histopatológicos (invasão de linfonodos regionais, grau de diferenciação e subtipo imunoistoquímico do tumor) e idade de diagnóstico do câncer, selecionados de acordo com a disponibilidade das informações presentes nos laudos das pacientes.

O Qui-Quadrado de homogeneidade não demonstrou diferenças significativas quando o total de pacientes com genótipo considerado de risco foi comparado com aqueles sem genótipo de risco, para nenhum dos parâmetros analisados: invasão de linfonodos regionais  $\chi^2 = 1,19$  e  $p > 0,25$  (GL=1); grau de diferenciação tumoral  $\chi^2 = 2,01$  e  $p > 0,30$  (GL=2) e subtipo imunoistoquímico  $\chi^2 = 0,405$  e  $p > 0,90$  (GL=3) (TABELAS 6 e 7).

TABELA 6 - ANÁLISE DE QUI-QUADRADO DE HOMOGENEIDADE PARA INVASÃO DE LINFONODOS E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL

	<b>Linfonodo Positivo</b>	<b>Linfonodo Negativo</b>	<b>Grau I</b>	<b>Grau II</b>	<b>Grau III</b>
GG	166	160	166	144	16
GC/CC	242	169	242	148	21
Qui Quadrado	$\chi^2 = 1,19$ ; $p > 0,25$		$\chi^2 = 2,01$ ; $p > 0,30$		

Fonte: a Autora (2018).

TABELA 7 - ANÁLISE DE QUI-QUADRADO DE HOMOGENEIDADE PARA SUBTIPOS IMUNOISTOQUÍMICOS

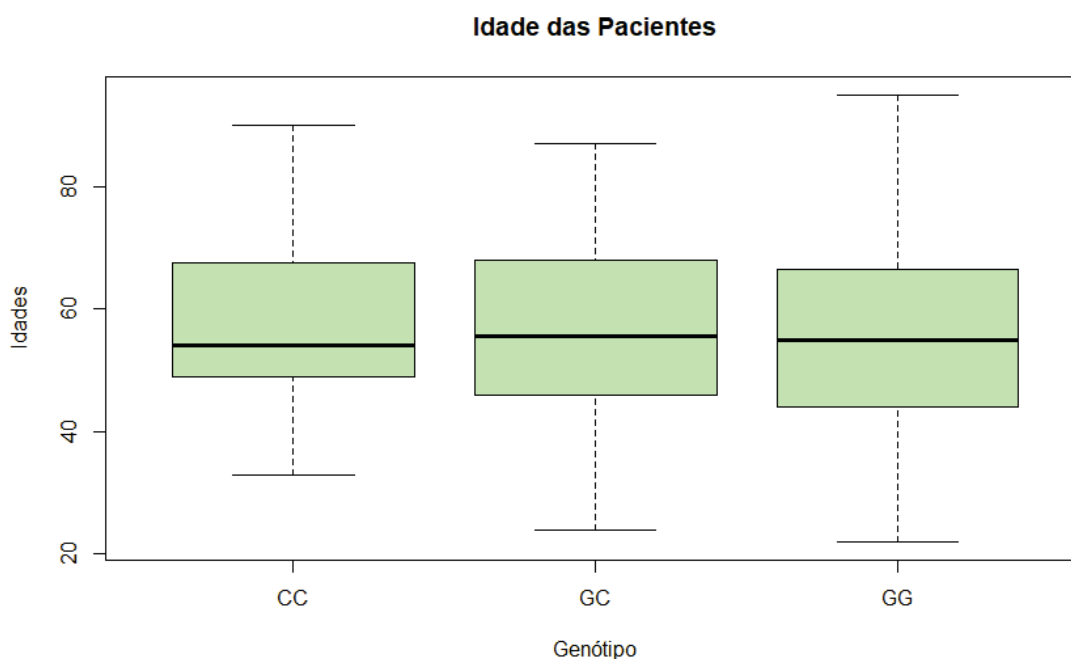
	<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B</b>	<b>HER2+</b>	<b>Triplo-Negativo</b>
GG	43	39	8	14
GC/CC	41	39	7	17
Qui Quadrado	$\chi^2 = 0,405$ ; $p > 0,90$			

Fonte: a Autora (2018).

Para análise do SNP rs2910164 no gene *MIR146A* em relação à idade de diagnóstico realizou-se o teste de Bartlett que indicou homogeneidade entre as

variâncias analisadas ( $p=0,96$ ). A análise de variância não demonstrou diferença estatisticamente significativa. O GRÁFICO 1 mostra as distribuições das idades nos diferentes genótipos.

GRÁFICO 1 - BOXPLOT DA DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DAS PACIENTES POR GENÓTIPO



Fonte: a Autora (2018).

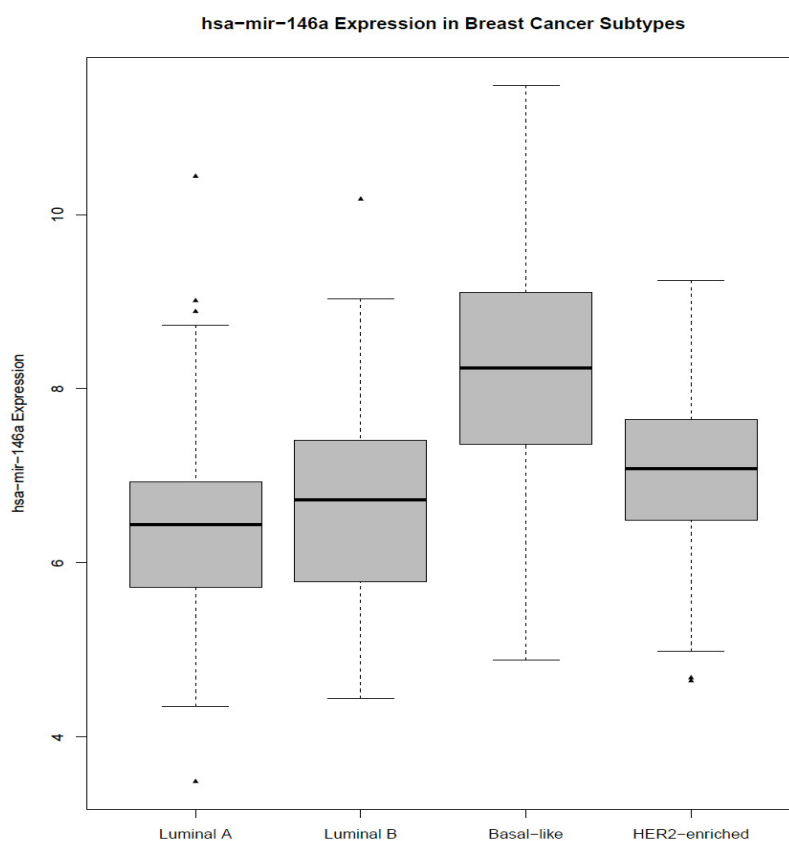
#### 6.4 EXPRESSÃO DO GENE *MIR146A* NAS AMOSTRAS DO TCGA

Na análise realizada dos dados de expressão de RNAs dos bancos de sequenciamento de RNA do TCGA, através do pacote *TCGAbiolinks* do *R/Bioconductor*, observou-se que o *MIR146A* é significativamente mais expresso em tecido tumoral de câncer de mama do que no tecido não tumoral adjacente ( $Fold\ Change=0,68$ ).

Foi realizada também a análise de Kruskal-Wallis com os dados de expressão do TCGA seguida pelo teste de Dunn para se comparar a expressão nos subtipos moleculares intrínsecos: Luminal A, Luminal B, Basal e HER2 enriquecido (GRÁFICO 2). Esta classificação difere da utilizada na análise dos

pacientes pois se baseia em perfil de expressão de centenas de genes e não na classificação imunoistoquímica.

GRÁFICO 2 - BOXPLOT EXPRESSÃO DO MIR146A NOS SUBTIPOS MOLECULARES



FONTE: a Autora (2017).

LEGENDA: Análise da diferença de expressão do *MIR146A* entre os subtipos Luminal A, Luminal B, *Basal-like*, *HER2 enriched* realizada com dados do TCGA.

O teste de Kruskal-Wallis apresentou resultado significativo ( $p < 0,05$ ) por isso, em seguida utilizou-se o teste de Dunn para identificar entre quais pares de subtipos está a diferença (GRÁFICO 3). Observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre: Luminal A e *Basal-like*, Luminal A e *HER2-enriched*, Luminal B e *Basal-like* e *HER2-enriched* e *Basal-like*.

GRÁFICO 3 - RESULTADO DO TESTE DE DUNN DIFERENÇA DA EXPRESSÃO DO *MIR146A* ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES

Col	Mean-					
Row	Mean		1	2	3	4
2		-2.341384				
		0.0961				
3		-9.760915	-6.814210			
		0.0000*	0.0000*			
4		-3.606734	-1.682021	3.998379		
		0.0016*	0.4628	0.0003*		

alpha = 0.05

FONTE: a Autora (2017).

LEGENDA: Análise da diferença de expressão em dados do TCGA do *MIR146A* entre os subtipos Luminal A (correspondendo ao número 1), Luminal B (correspondendo ao número 2), *Basal-like* (correspondendo ao número 3), *HER2 enriched* (correspondendo ao número 4). Os pares que apresentaram diferença estatisticamente significativa estão marcados com um asterisco (\*) ao lado de seu valor de p (segunda linha de cada comparação).

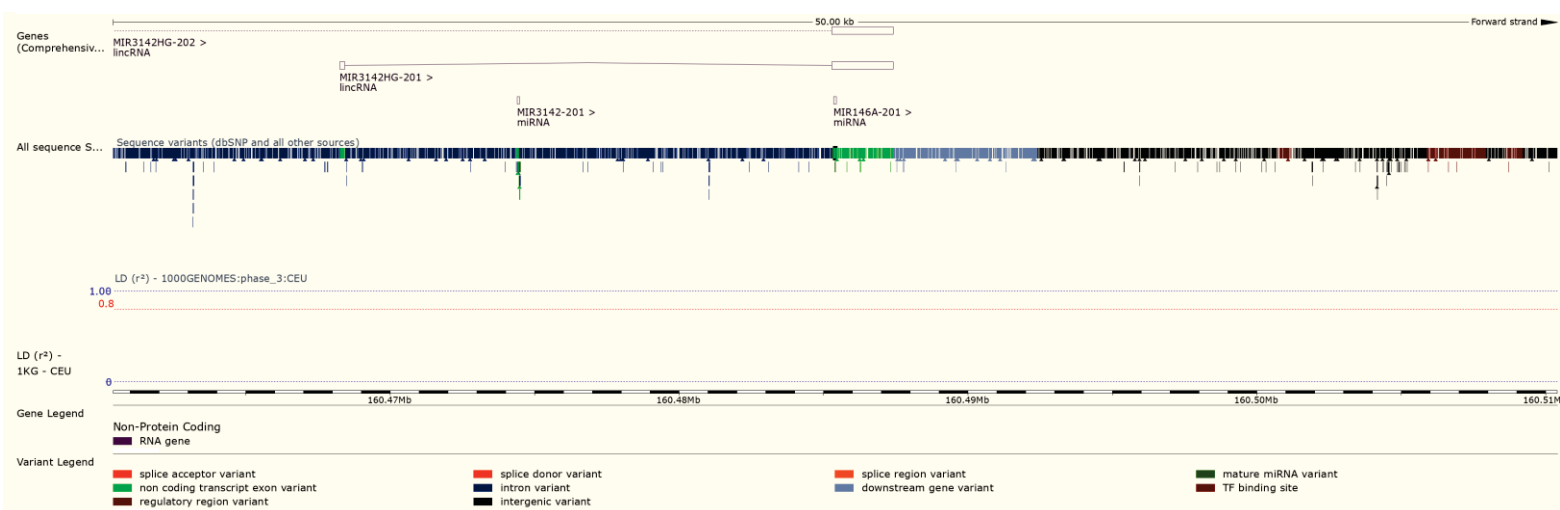
## 6.5 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO GENE *MIR146A* E A EXPRESSÃO DO GENE *BRCA1* NAS AMOSTRAS DO TCGA

O teste de correlação entre a expressão do gene *MIR146A* e do gene *BRCA1* realizado utilizando-se os dados de expressão de tumores de mama disponíveis no TCGA não mostrou correlação entre a expressão destes genes (cor= 0,011, p= 0,77). Realizou-se também os testes de correlação para cada subtipo molecular intrínseco, sendo que em nenhum dos subtipos observou-se correlação: Luminal A (cor= 0,047, p=0,50); Luminal B (cor=-0,10, p=0,30); Basal (cor=0,11, p=0,31); HER2 enriquecido (cor=0,10, p=0,48). Testou-se também a correlação entre os genes em dados de expressão de tumores com informação de classificação imunoistoquímica, análise na qual também não se encontrou correlação: Luminais (cor=-0,020, p=0,67); HER2 positivo (cor=0,26, p=0,17); Triplo-negativo (cor=0,14, p=0,15).

## 6.6 RESULTADO DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO NO ENSEMBL

Para se analisar se já havia algum polimorfismo descrito por estar em desequilíbrio de ligação com o rs2910164 consultou-se a plataforma do ENSEMBL onde nenhum polimorfismo em desequilíbrio de ligação foi previsto (FIGURA 13).

FIGURA 13 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PREVISTO PARA O RS2910164



FONTE: EMSEMBL *Linkage Disequilibrium Data*, ZERBINO *et al.* (2018).

LEGENDA: Nenhum polimorfismo calculado para estar em desequilíbrio de ligação com o rs2910164, o browser do ENSEMBL calcula os valores de  $r^2$  que correspondem a correlação entre os pares de loci.

## 7 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea que envolve diferentes alterações moleculares, composição celular e parâmetros clínicos. Na clínica além da classificação histológica e do estabelecimento do grau de diferenciação histológico, a classificação imunoistoquímica em subtipos é a principal responsável pelo direcionamento e sucesso do tratamento das pacientes. O diagnóstico precoce, a descoberta de novos biomarcadores para os subtipos moleculares e a definição de fatores de risco são importantes na redução das taxas de mortalidade por esta doença.

Os miRNAs podem atuar como fatores de risco e possíveis biomarcadores no câncer de mama, desde que diferentes miRNAs já foram descritos por atuar modulando a expressão de genes supressores de tumor e de oncogenes (CROCE, 2009). Sabe-se que pequenas alterações em uma sequência de miRNA podem levar a consequências fenotípicas grandes, pois as variações genéticas como os SNPs podem influenciar o nível de expressão dos miRNAs e a sua função (UPADHYAYA et al., 2015).

No presente estudo, selecionou-se o SNP rs2910164, localizado na região *seed* do gene *MIR146A*, para avaliar sua possível associação com o câncer de mama em uma amostra de população brasileira de Curitiba-PR. As frequências alélicas do polimorfismo rs2910164 variam de uma população para outra conforme mostrado no QUADRO 1. Devido a esta variação nas frequências e às diferentes interações que ocorrerão em consequência, alelos considerados de risco em uma população, podem ser considerados alelos de proteção em outras populações (UPADHYAYA et al., 2015). As frequências alélicas do grupo de controles são semelhante às frequências alélicas das populações americanas de descendentes de europeus “CEU” e “NHLBI E\_A” com 76% e 77% de alelo G e 24% e 23% de alelo C, respectivamente (frequências retiradas do site do projeto *HapMap*, *1000 Genomes* e do projeto de Sequenciamento Humano *NHLBI*). Este fato era esperado visto que a população de Curitiba é uma população brasileira, miscigenada, que tem em sua maioria ancestralidade europeia (PROBST et al., 2000). Inclusive, em um estudo do nosso grupo de pesquisa que acessou por análise de componente principal a ancestralidade de 15 pacientes do nosso banco de amostras de Curitiba, foi observado que nossas pacientes se agrupam

principalmente com os indivíduos europeus (SUGITA *et al.*, comunicação pessoal).

Ao analisarmos as frequências genotípicas do grupo controle observamos que estas se mostraram de acordo com as frequências esperadas pelo teorema de Hardy-Weinberg, diferentemente, as frequências genotípicas observadas no grupo de pacientes se mostraram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Concluímos assim, que o câncer é um fator que muda as premissas para este grupo, desde que as pacientes com câncer de mama são portadoras do alelo C em maior frequência do que o esperado ao acaso e do que as mulheres do grupo controle.

Formulamos a hipótese de que C é o alelo de risco de risco seguindo o modelo dominante. No nosso estudo, os genótipos que continham o alelo C revelaram-se como sendo um fator de risco para o câncer de mama, com OR calculado de 1,38 e intervalo de confiança 95% calculado de 1,03 a 1,85, enquanto que o alelo C em si ficou próximo ao limite de significância para ser um fator de risco. O alelo C já foi descrito como alelo de risco em diversos estudos, como no estudo de Dai *et al.* de 2015 que encontrou resultados semelhantes ao nosso em uma meta-análise de estudos caso-controle de população de origem europeia. No presente estudo, o modelo dominante resultou em melhores resultados sendo que os genótipos GC/CC foram confirmados como de risco para câncer de mama. Na meta-análise de Ma *et al.* (2013) também se observou que o alelo C do rs2910164, em populações europeias, representa um fator de risco para desenvolvimento de câncer de mama.

O estudo de Lian, Wang e Zhang de 2012, por sua vez, identificou como genótipo de risco o CC quando comparado ao risco de GC/GG, ao estudar o polimorfismo em uma meta-análise de quatro estudos do tipo caso-controle de populações europeias. Em nosso estudo, ao realizarmos as comparações entre os três genótipos pelo teste do qui-quadrado de contingência, não encontramos diferenças significativas (TABELA 5). As frequências de CC observadas foram as mesmas no grupo controle e no grupo de pacientes (5% de CC em cada grupo) e a maior diferença encontrada foi entre as frequências do genótipo GC entre os grupos. O qui-quadrado de contingência da TABELA 5 confirmou a presença de uma distribuição significativamente diferente de GC/CC entre o grupo de pacientes e controles, corroborando o resultado de nosso teste de OR



(com frequências no grupo câncer: GG 51%, n=166 e GC/CC 49%, n=160; e no grupo controle: GG 59%, n=242 e GC/CC 41%, n=169).

Ao contrário dos nossos resultados e dos resultados de autores citados acima, outros autores não encontraram associação do polimorfismo rs2910164 com o câncer de mama (CATUCCI *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2013; CHEN; WANG; ZHANG, 2014; MU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Não se observou nenhum efeito do SNP rs2910164 em relação à idade de diagnóstico (GRÁFICO 1), parâmetro em que diferentes estudos já apresentaram resultados controversos. No estudo de Catucci *et al.* de 2010 que estudou casos de câncer de mama familiar, observou-se que o polimorfismo rs2910164 não estava associado com a idade de diagnóstico de câncer de mama, o que não corroborou os resultados do estudo de Shen *et al.* (2008) que relatou que o polimorfismo rs2910164 estava associado com a idade precoce de diagnóstico. Os estudos que não envolveram câncer de mama hereditário ou familiar, assim como o nosso, não relataram associação do polimorfismo com idade de diagnóstico do câncer de mama (CARDEÑOSA *et al.*, 2012; QI *et al.*, 2015; MCVEIGH *et al.*, 2017; BARJUI *et al.*, 2017). Observa-se que esses estudos foram realizados com populações irlandesa, chinesa, iraniana e espanhola, respectivamente, não havendo descrições na literatura de estudos semelhantes, que testaram a idade de diagnóstico, em população europeia não hispânica.

No presente estudo também não se encontrou diferença significativa para os parâmetros de invasão de linfonodos regionais, grau de diferenciação tumoral e subtipo imunoistoquímico (TABELAS 6 e 7), como no estudo de Mcveigh *et al.* (2017) e Qi *et al.* (2015) que trabalharam com uma população australiana e chinesa, ambos já citados acima, indicando que este polimorfismo provavelmente não está relacionado com a progressão tumoral. Ao analisarmos a literatura, identificamos poucos estudos que tenham analisado o polimorfismo rs2910164 em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos, principalmente em relação aos subtipos, sendo que a maioria dos estudos citados em nosso trabalho somente apresentaram a informação do polimorfismo como um fator de risco ou não para o câncer de mama.

O câncer de mama triplo negativo geralmente tem a inativação do gene supressor de tumor *BRCA1* e no estudo de M'Hamed e colaboradores de 2015

sugeriu-se que esta inativação poderia estar acontecendo no nível pós-transcricional através da regulação por miRNAs. M'Hamed *et al.* (2015), ao analisarem a expressão de 5 miRNAs cujo alvo predito era o *BRCA1*, dentre eles o miR-146a, em linhagens de células de câncer de mama, não conseguiram demonstrar que o miR-146a reduzisse os níveis de expressão da proteína BRCA1. Em nossa análise *in silico* observamos no banco de dados do TCGA que o miR-146a se mostrou mais expresso no câncer de mama do que no tecido não tumoral adjacente, e no subtipo triplo negativo (GRÁFICOS 2 E 3). Este resultado parece fazer sentido à luz da hipótese do trabalho de M'Hamed, o dos resultados encontrados por Shen e colaboradores (2008) que demonstraram através de ensaios de luciferase que o miR-146a se liga à 3' UTR do *BRCA1*. Em nosso estudo, ao analisarmos dados de transcrição do TCGA, não encontramos correlação entre os níveis de expressão do *MIR146A* e *BRCA1*. Em alguns artigos observou-se que o alelo C apresenta maior estabilidade e maior afinidade de ligação pelo *BRCA1* quando comparado ao alelo G (SHEN *et al.*, 2008), justificando que o alelo C atue como alelo de risco para o desenvolvimento do câncer de mama em geral e no subtipo triplo-negativo. Na nossa análise em pacientes, apesar de não ter havido significância estatística entre os grupos, nota-se uma maior presença do alelo C (genótipos GC+CC) no subtipo triplo negativo (55%, *versus* 49% para luminal A, 46% para HER2+ e 50% para luminal B).

Outra questão a ser resolvida é uma aparente contradição em relação à expressão de miR-146a entre os dados do TCGA, que mostra um aumento de expressão no câncer de mama, e outros dados da literatura. Se considerarmos o alelo C como alelo de risco, como demonstramos neste estudo e vários outros já citados, deveríamos esperar uma diminuição da expressão de miR-146a em pacientes, desde que, como já descrito por Jazdzewski *et al.* (2008) o alelo C produz duas vezes menos miRNA maduro do que o alelo G. Este resultado também foi encontrado no estudo de Qi *et al.* (2015), no qual foi observada a associação entre o alelo C e a redução dos níveis de produção do miR-146a maduro em uma amostra de câncer de mama de uma população chinesa. Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real e os níveis de miR-146a observados se mostraram drasticamente reduzidos no genótipo CC. No estudo de Yin *et al.* (2017) com pacientes de câncer de pulmão observou-se uma diferença

significativa na expressão do miR-146a entre os três genótipos, o genótipo GG apresentando a maior expressão, seguido pelo GC e com menor expressão o CC.

Essa redução de expressão do miRNA maduro pode estar alterando a regulação de seus genes alvo. No estudo de Bhaumik *et al.* de 2008 mostrou-se que o miR-146a reduz os níveis de IRAK1 e TRAF6, componentes essenciais das vias de sinalização *Toll-like* e IL-1 que ativam NF- $\kappa$ B. Como consequência dessa redução, ocorre redução da ativação do NF- $\kappa$ B, o que neste estudo reduziu a capacidade de migração e invasão das células de câncer MDA-MB-231. Os estudos que envolvem NF- $\kappa$ B mostram que a mesma é responsável por uma cascata de sinalização que controla a habilidade de células tumorais de escapar da apoptose e de aumentar a angiogênese e invasão do tumor (KARIN, 2006; VAN WAES, 2007). Li *et al.* (2010) reportaram em seu estudo com células de câncer de pâncreas que o miR-146a é capaz de inibir a capacidade de invasão das células ao levar à redução nos níveis de EGFR e de IRAK1. Em um estudo com linhagens de células de câncer cervical e colorretal, observou-se que o miR-146a aumenta a expressão dos supressores de tumor *TP53* e do marcador de células epiteliais *CDH1*, cuja perda de função está associada ao aumento proliferativo, invasivo e surgimento de metástases (SATHYANARAYANAN; CHANDRASEKARAN; KARUNAGARAN, 2016). Foi observado também no estudo de Zhang *et al.* (2015), que o miR-146a aumenta a expressão do supressor de tumor *APC*, o que reduz a metástase e invasão ao reduzir a expressão de VEGF. Estes estudos reforçam a importância de se estudar o polimorfismo rs2910164 em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos como presença/ausência de invasão de linfonodos regionais, presença/ausência de metástase à distância, grau histológico e subtipo imunoistoquímico.

Como os estudos de meta-análise de Ma *et al.* (2013) e Wang A. *et al.* (2012) já evidenciaram, a associação entre o polimorfismo rs2910164 e o câncer de mama depende da população estudada, provavelmente devido a diferenças nos *backgrounds* genéticos das populações como diferentes frequências alélicas ou os variados mecanismos carcinogênicos e exposição a carcinógenos. Outra possibilidade levantada foi de que o polimorfismo sendo testado não fosse a variante causal, mas estivesse em desequilíbrio de ligação com a verdadeira

variante causal, porém, observamos que não há nenhum desequilíbrio de ligação descrito para este polimorfismo nem previsto no ENSEMBL (FIGURA 13). Nosso estudo, por exemplo, demonstrou que na população brasileira de Curitiba o alelo C é uma variante de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo que outros estudos com populações chinesas descreveram o alelo G como sendo a variante de risco. Sendo assim, os dados aparentemente controversos do TCGA podem estar relacionados à origem da amostra estudada, que não foi selecionada e incluiu diversas etnias.

A identificação de SNPs que afetem a função ou a expressão gênica e contribuam na suscetibilidade ao câncer de mama são importantes na predição de riscos individuais e populacionais e para a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da doença (LIAN; WANG; ZHANG, 2012), podendo contribuir para melhor eficiência no diagnóstico, na escolha de tratamentos e na definição mais precisa de um prognóstico nos casos de câncer de mama.

No presente estudo a distribuição dos alelos não variou dentro dos parâmetros clínicos e histopatológicos estudados, por isso, com base nestes dados, sugerimos que o alelo C do polimorfismo rs2910164 confira maior suscetibilidade ao câncer de mama, mas não influencie na progressão da doença. Como perspectiva, seria muito interessante aumentar o número de pacientes do subtipo triplo-negativo para verificar se o alelo C realmente tem uma maior prevalência dentro deste grupo.

## 8 CONCLUSÕES

Observamos, de maneira inédita em uma população brasileira, que o polimorfismo rs2910164 localizado na região *seed* do miR-146a está positivamente associado com a suscetibilidade ao câncer de mama, sendo o alelo C, um alelo de risco para a doença.

Como a distribuição dos alelos não variou dentro dos parâmetros clínicos e histopatológicos estudados, sugerimos que o alelo C influencie somente na suscetibilidade e não influencie na progressão da doença.

A análise de expressão a partir dos dados do TCGA, mostrando uma maior expressão em tecido tumoral do que no não tumoral e mais especificamente no subtipo triplo-negativo, levanta a hipótese de uma possível associação com este subtipo, mas necessita de mais dados para que se possa concluir a respeito.

## REFERÊNCIAS

- ALSHATWI, A. A. *et al.* **Differential Expression Profile and Genetic Variants of MicroRNAs Sequences in Breast Cancer Patients.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e30049, 20 fev. 2012.
- AMORIM, M. *et al.* **Decoding the usefulness of non - coding RNAs as breast cancer markers.** *Journal of Translational Medicine*, p. 1–15, 2016.
- AUYEUNG, V. C. *et al.* **Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing.** *Cell*, v. 152, n. 4, p. 844–858, fev. 2013.
- BARJUI, S. P. *et al.* **Study of correlation between genetic variants in three microRNA genes (hsa-miR-146a, hsa-miR-502 binding site, hsa-miR-27a) and breast cancer risk.** *Current Research in Translational Medicine*, v. 5, p. 1–7, 2017.
- BARTEL, D. P. **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.** *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J. D.; CUI, Y. **PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways.** *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. D86–D91, jan. 2014.
- BHAUMIK, D. *et al.* **Expression of microRNA-146 suppresses NF-κB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells.** *Oncogene*, v. 27, n. 42, p. 5643–5647, 18 set. 2008.
- BLENKIRON, C. *et al.* **Open Access MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype.** v. 8, n. 10, 2007.
- CALIN, G. A. *et al.* **A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia.** *N Engl J Med*, v. 353, n. 17, p. 1793–1801, 2005.
- CALIN, G. A. *et al.* **Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 24, p. 15524–9, 2002.
- CARDEÑOSA, E. E. *et al.* **Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer.** *Familial Cancer*, v. 11, n. 4, p. 629–636, 29 dez. 2012.
- CATUCCI, I. *et al.* **Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases.** *Human Mutation*, v. 31, n. 1, p. 1052–1057, 2010.
- CAVENEY, W. K.; WHITE, R. L. **The Genetic Basis of Cancer.** *Scientific American*, 1995.
- CHEN, G. *et al.* **miR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces**

**Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2013.

CHEN, Q. H.; WANG, Q. B.; ZHANG, B. **Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: A HuGE meta-analysis.** *Tumor Biology*, v. 35, n. 1, p. 529–543, 2014.

CHOO, K. B. *et al.* **MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells.** *Journal of Biomedical Science*, v. 21, n. 1, p. 95, 5 dez. 2014.

COLAPRICO, A. *et al.* **TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data.** *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 8, p. e71, 2016.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. ***The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition.*** [S.l: s.n.], 2007.

CROCE, C. M. **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.** *Nature reviews. Genetics*, v. 10, n. 10, p. 704–14, out. 2009.

DAI, Z.-J. *et al.* **Five common functional polymorphisms in microRNAs (rs2910164, rs2292832, rs11614913, rs3746444, rs895819) and the susceptibility to breast cancer: evidence from 8361 cancer cases and 8504 controls.** *Current pharmaceutical design*, v. 21, n. 11, p. 1455–63, 2015.

DÖHNER, H. *et al.* **Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.** *The New England journal of medicine*, v. 343, n. 26, p. 1910–6, 2000.

DUAN, R.; PAK, C. H.; JIN, P. **Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA.** *Human Molecular Genetics*, v. 16, n. 9, p. 1124–1131, 2007.

DURBIN, R. M. *et al.* **A map of human genome variation from population-scale sequencing.** *Nature*, v. 467, n. 7319, p. 1061–1073, 2010.

EHEMAN, C. R. *et al.* **The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004.** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 18, n. 6, p. 1763–1769, 2009.

ELLISEN, L. W.; HABER, D. A. **Basic principles of cancer genetics.** ***Principles of Clinical Cancer Genetics: A Handbook from the Massachusetts General Hospital.*** [S.l: s.n.], 2010. p. 1–22.

EROLE, P. *et al.* **Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways.** *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nature reviews. Cancer*, v. 6, n. 4, p. 259–69, 2006.

GARCIA, A. I. *et al.* **Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers.** p. 279–290, 2011.

GIALLOMBARDO, M. *et al.* **Exosome-mediated drug resistance in cancer:**



**the near future is here.** *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, p. 2015–2017, 2016.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* **Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013.** *Annals of Oncology*, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.

GRIMSON, A. *et al.* **MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing.** *Molecular Cell*, v. 27, n. 1, p. 91–105, jul. 2007.

GROSS, J; LIGGES, U. **nortest: Tests for Normality.** R package version 1.0-4. 2015. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nortest>

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HE, B. *et al.* **Associations of polymorphisms in microRNAs with female breast cancer risk in Chinese population.** p. 4575–4582, 2015.

HIRSCHHORN, J. N. *et al.* **A comprehensive review of genetic association studies.** *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, v. 4, n. 2, p. 45–61, 2002.

HOFFMAN, A. E. *et al.* **microRNA miR-196a-2 and breast cancer: A genetic and epigenetic association study and functional analysis.** *Cancer Research*, v. 69, n. 14, p. 5970–5977, 2009.

HON, L. S.; ZHANG, Z. **The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression.** *Genome Biology*, v. 8, n. 8, p. R166, 2007.

HOU, Z. *et al.* **MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis.** *Medical Oncology*, v. 29, n. 2, p. 886–892, 2012.

HRDLICKOVA, B. *et al.* **Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 10, p. 1910–1922, 2014.

HU, Y. *et al.* **MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer.** *Scientific reports*, v. 4, p. 3648, 2014.

HU, Z. *et al.* **Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women.** *Human Mutation*, v. 30, n. 1, p. 79–84, 2009.

HU, Z. *et al.* **Genetic variants of miRNA sequences and non – small cell lung cancer survival.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 7, p. 2600–2608, 2008.

HUANG, A. J. *et al.* **Polymorphism rs4919510:C> in mature sequence of human microRNA-608 contributes to the risk of HER2-positive breast cancer but not other subtypes.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.



INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Atlas da Mortalidade**. 2015. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em fevereiro de 2018. INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2018: Incidências de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>, 2018. Acesso em fevereiro de 2018.

IORIO, M. V; CROCE, C. M. **MicroRNA dysregulation in cancer : diagnostics , monitoring and therapeutics** . A comprehensive review. p. 143–159, 2012.

JAZDZEWSKI, K. *et al.* **Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 20, p. 7269–7274, 2008.

JAZDZEWSKI, K. *et al.* **Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer.** p. 1–4, 2009.

KAN, Y. W.; DOZY, A. M. **Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, n. 11, p. 5631–5, 1978.

KARIN, M. **Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression.** *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 431–436, 25 maio 2006. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04870>.

KARLSSON, M. C. *et al.* **Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system.** *Molecular Oncology*, v. 11, n. 7, p. 781–791, 2017.

KIM, V. N. **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 5, p. 376–385, 2005.

KNUDSON, A. G. **Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 68, n. 4, p. 820–823, 1971.

KOTLAREK, M. *et al.* **The rs2910164 Genetic Variant of miR-146a-3p Is Associated with Increased Overall Mortality in Patients with Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 655, 2018.

LI, W. *et al.* **Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer.** *Journal of medical genetics*, v. 46, n. 5, p. 358–60, 2009.

LI, Y. *et al.* **miR-146a Suppresses Invasion of Pancreatic Cancer Cells.** *Cancer Research*, v. 70, n. 4, p. 1486–1495, 15 fev. 2010.

LIAN, H.; WANG, L.; ZHANG, J. **Increased Risk of Breast Cancer Associated with CC Genotype of Has-miR-146a Rs2910164 Polymorphism in Europeans.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e31615, 20 fev. 2012.

LIU, C. *et al.* **MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target**

- sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs.** *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, p. 661, 2012.
- LU, J. *et al.* **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature*, v. 435, n. 7043, p. 834–838, 2005.
- LUAN, Y. *et al.* **A single nucleotide polymorphism in hsa-miR-146a is responsible for the development of bronchial hyperresponsiveness in response to intubation during general anesthesia.** *Molecular Medicine Reports*, v. 14, n. 3, p. 2297–2304, 2016.
- MA, X. P. *et al.* **Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, 2013.
- MCVEIGH, T. P. *et al.* **Investigating the association of rs2910164 with cancer predisposition in an Irish cohort.** *Endocrine Connections*, v. 6, n. 8, p. 614–624, 2017.
- MEI, J.; BACHOO, R.; ZHANG, C.-L. **MicroRNA-146a Inhibits Glioma Development by Targeting Notch1.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 31, n. 17, p. 3584–3592, 2011.
- MENEZES DE MEDEIROS, J. *et al.* **Perfil epidemiológico e estudo de sobrevida dos pacientes com câncer de mama atendidos no Hospital Erasto Gaertner em Curitiba, PR.** *Revista Brasileira de Mastologia*, v. 26, n. 3, p. 107–112, 2016.
- MU, K. *et al.* **Meta-analysis of the association between three microRNA polymorphisms and breast cancer susceptibility.** v. 8, n. 40, p. 68809–68824, 2017.
- M'HAMED, I. F. *et al.* **Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers.** *Cellular Oncology*, v. 38, n. 6, p. 433–442, 2015.
- MULUHNGWI, P.; KLINGE, C. M. **Identification of miRNAs as biomarkers for acquired endocrine resistance in breast cancer.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 456, p. 76–86, 2017.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). **What is Cancer?** Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> Acessado em março de 2018.
- OLDENBURG, R. A. *et al.* **Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 63, p. 125–149, 2007.
- OMRANI, M. *et al.* **hsa-mir-499 rs3746444 gene polymorphism is associated with susceptibility to breast cancer in an Iranian population.** *Biomarkers in medicine*, v. 8, n. 2, p. 259–267, fev. 2014.
- PASTRELLO, C. *et al.* **Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1 / BRCA2 -negative familial breast and ovarian cancer patients.** v. 31, n. 12, p. 2124–2126, 2010.

PENG, Y.; CROCE, C. M. **The role of MicroRNAs in human cancer.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 1, n. 1, p. 15004, 28 dez. 2016.

PERMUTH-WEY, J. *et al.* **A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma.** *Journal of Neuro-Oncology*, v. 105, n. 3, p. 639–646, 9 dez. 2011.

PEROU, C. M. *et al.* **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature*, v. 406, n. May, p. 747–752, 2000.

PRAT, A. *et al.* **Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, n. 2, p. 203–209, 2013.

PROBST, C. M. *et al.* **HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil.** *Human biology*, v. 72, n. 4, p. 597–617, ago. 2000.

QI, P. *et al.* **Associations of miRNA polymorphisms and expression levels with breast cancer risk in the Chinese population.** *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 2, p. 6289–6296, 2015.

**R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAKHA, E. A. *et al.* **Expression profiling technology: Its contribution to our understanding of breast cancer.** *Histopathology*, v. 52, n. 1, p. 67–81, 2008.

RODRIGUEZ, A. *et al.* **Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units.** p. 1902–1910, 2004.

RYAN, B. M.; ROBLES, A. I.; HARRIS, C. C. **Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research.** *Nat Rev Cancer*, v. 10, n. 6, p. 389–402, 2010.

SANDHU, R. *et al.* **Overexpression of miR-146a in basal-like breast cancer cells confers enhanced tumorigenic potential in association with altered p53 status.** *Carcinogenesis*, v. 35, n. 11, p. 2567–2575, 2014.

SATHYANARAYANAN, A.; CHANDRASEKARAN, K. S.; KARUNAGARAN, D. **microRNA-146a inhibits proliferation, migration and invasion of human cervical and colorectal cancer cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 480, n. 4, p. 528–533, 2016.

SAUNDERS, M. A; LIANG, H.; LI, W.-H. **Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 9, p. 3300–5, 2007.

SHEN, J. *et al.* **A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis.** *Carcinogenesis*, v. 29, n. 10, p. 1963–1966, 2008.

SORLIE, T. *et al.* **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

SØRLIE, T. *et al.* **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SOUTHERN, E. M. **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *Journal of Molecular Biology*, v. 98, n. 3, 1975.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014.** *World Health Organization*, p. 630, 2014.

SUGITA, B, M. *et al.* **Integrated analysis of copy number and miRNA profiling in triple negative breast cancer of Latina women. [abstract].** In: *Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2016;76(14 Suppl):Abstract nr 1944.

TOMASKOVIC-CROOK, E.; THOMPSON, E. W.; THIERY, J. P. **Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer.** *Breast cancer research : BCR*, v. 11, p. 213, 2009.

TORRE, L. A. *et al.* **Global Cancer Statistics, 2012.** *CA: a cancer journal of clinicians.*, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TURNER, N. C. *et al.* **BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer.** *Oncogene*, v. 26, n. 14, p. 2126–2132, 2007.

UPADHYAYA, Akanksha *et al.* **Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study.** *Gene*, 2015. , v. 576, p. 256–260.

VAN SCHOONEVELD, E. *et al.* **Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management.** *Breast cancer research : BCR*, v. 17, p. 21, 2015.

VAN WAES, C. **Nuclear Factor- B in Development, Prevention, and Therapy of Cancer.** *Clinical Cancer Research*, v. 13, n. 4, p. 1076–1082, 15 fev. 2007.

WANG, A. X. *et al.* **Meta-analysis confirms that a common G/C variant in the pre-miR-146a gene contributes to cancer susceptibility and that ethnicity, gender and smoking status are risk factors.** *Genetics and molecular research : GMR*, v. 11, n. 3, p. 3051–3062, 2012.

WANG, M. *et al.* **Genetic variants in miRNAs predict bladder cancer risk and recurrence.** *Cancer Research*, v. 72, n. 23, p. 6173–6182, 2012.

WANG, Y.; YANG, B.; REN, X. **Hsa-miR-499 polymorphism (rs3746444) and cancer risk: A meta-analysis of 17 case-control studies.** *Gene*, v. 509, n. 2, p. 267–272, 2012.

WEINBERG, R. **Oncogenes and Tumor Suppressor Genes.** *CA Cancer J Clin*, v. 44, n. Suppl 7, p. S8, 1994.

WEINBERG, R. **The Biology of Cancer, Second Edition.** [S.l.]: Garland Science, 2014.

WICKHAM, H.; BRYAN, J. **readxl: Read Excel Files. R package version 1.0.0.** 2017. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>

WOJCICKA, A.; DE LA CHAPELLE, A.; JAZDZEWSKI, K. **MicroRNA-related sequence variations in human cancers.** *Human Genetics*, v. 133, n. 4, p. 463–469, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> Acesso em abril de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012.** Acesso em setembro de 2017.

XIANG, W. *et al.* **PTTG1 regulated by miR-146-3p promotes bladder cancer migration, invasion, metastasis and growth.** *Oncotarget*, v. 8, n. 1, p. 664–678, 2017.

XU, B. *et al.* **A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo.** *The Prostate*, v. 70, n. 5, p. 467–72, 2010.

XU, T. *et al.* **A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma.** *Carcinogenesis*, v. 29, n. 11, p. 2126–2131, nov. 2008.

XU, Y. *et al.* **Different Effects of Three Polymorphisms in MicroRNAs on Cancer Risk in Asian Population: Evidence from Published Literatures.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. e65123, 4 jun. 2013.

YANG, R. *et al.* **A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk.** *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 121, n. 3, p. 693–702, 18 jun. 2010.

YIN, Z. *et al.* **MiR-146a polymorphism correlates with lung cancer risk in Chinese nonsmoking females.** *Oncotarget*, v. 8, n. 2, p. 2275–2283, 2017.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. **Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage.** *Cancer Science*, v. 95, n. 11, p. 866–871, 2004.

ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. **Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha.** *The EMBO Journal*, v. 24, n. 1, p. 138–148, 2005.

ZERBINO, D. R. *et al.* **Ensembl 2018.** *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. D1, p. D754–D761, 2018.

ZHANG, H. *et al.* **Association between three functional microRNA polymorphisms (miR-499 rs3746444, miR-196a rs11614913 and miR-146a rs2910164) and breast cancer risk: a meta-analysis.** *Oncotarget*, v. 8, n. 1, p. 393–407, 3 jan. 2017.

ZHANG, Z. *et al.* **MicroRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma.** *Molecular Cancer*, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2015.

ZOU, P. *et al.* **Hsa -mir-499 rs3746444 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis.** *Journal of Biomedical Research*, v. 26, n. 4, p. 253–259, 2012.



## APÊNDICE 1 - INFORMAÇÕES DAS PACIENTES DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO

Dados Pacientes de Câncer de Mama Esporádico											
Amostra:	Genótipo (G)	Genótipo (C)	Idade	Subtipo	ER	PR	ERBB2	Ki67	Linfonodo	Grau	Subtipo
3	G	G	34	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
5	G	C	60	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
10	G	G	65	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
25	G	C	79	Carcinoma Papilar Invasivo							
28	G	C		Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
29	G	C	47	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
30	G	C	86	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
35	G	G	57	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
37	G	C	61	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
40	G	G	72	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
42	G	C	52	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
43	G	C	52	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (2+)		NEG	II	Luminal A
44	G	G	29	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
47	G	G	71	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
126	G	G	75	Carcinoma Ductal Colóide							
128	G	G	72	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
129	G	C	74	Carcinoma Ductal Invasor						II	
136	G	G	48	Carcinoma Ductal Invasor	POS				NEG	III	Luminal
145	G	G	70	Carcinoma Papilar Invasivo					NEG	I	
169	G	C	53	Carcinoma Ductal Invasor						II	
170	G	G	40	Carcinoma Invasor					POS		
171	G	C	60	Carcinoma Medular			NEG		POS	III	
174	G	C	47	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (2+)		POS	II	Luminal A
175	G	G	51	Câncer de mama pouco diferenciado					POS		
177	G	G	58	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
182	G	G	57	Carcinoma Intraductal					NEG	II	
188	G	G	53	Carcinoma Medular	NEG	NEG	POS		NEG		HER2+
189	G	G	84	Carcinoma Túbulo-Lobular Invasor							
195	G	G	69	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
197	G	C	62	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS (3+)		POS	II	HER2+
198	G	C	81	Carcinoma Lobular Invasor	POS				NEG	I	Luminal
199	G	G	49	Carcinoma Tubular Invasor					POS	I	
203	G	C	57	Carcinoma Mucinoso Invasor					NEG		
204	G	G	75	Carcinoma Intraductal					NEG	II	
205	G	G	62	Carcinoma Ductal Invasor							
208	G	G	63	Carcinoma Ductal Invasor					NEG		
212	G	G	75	Carcinoma Ductal Invasor	NEG		NEG		POS	III	
220	C	C	63	Carcinoma Ductal					POS		
225	C	C	69	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
227	G	C	71	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG			II	Luminal A
229	G	G	78	Carcinoma Ductal Invasor	POS		POS (3+)		NEG	II	Luminal B
230	G	C	83	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
288	G	C	50	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
290	G	C	71	Carcinoma Ductal Invasor	POS		NEG (1+)		NEG	II	Luminal
305	G	G	56	Carcinoma Ductal Invasor	POS				POS	II	Luminal
308	G	C	39	Carcinoma Intraductal					NEG		
310	G	C	53	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS (3+)		POS	III	Luminal B
311	G	C	81	Carcinoma Inflamatório de Mama							
313	G	C	49	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
317	G	G		Carcinoma Ductal Invasor						II	
318	G	G	95	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
319	G	C	68	Carcinoma Lobular Invasor					NEG	I	
328	G	G	66	Carcinoma Ductal Invasor						II	
329	G	C	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS				NEG	II	Luminal
330	G	C	43	Carcinoma Ductal Invasor	POS				NEG	III	Luminal
333	G	G	87	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
334	C	C	51	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
335	G	G	51	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG (0)		NEG	II	Tripla Negativo
336	G	G	71	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
338	G	G	42	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG (0)		POS	III	Tripla Negativo
340	G	C	55	Carcinoma Lobular Invasor	POS				POS		Luminal
350	G	G	70	Carcinoma Lobular Invasor					NEG		
351	G	G	32	Câncer de mama pouco diferenciado					POS		
354	G	C	47	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
356	G	G	56	Carcinoma Ductal Invasor	POS				POS	III	Luminal
388	G	C	58	Carcinoma Medular					NEG		
389	G	C	82	Carcinoma Lobular Invasor					NEG	I	
390	G	C	43	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG (1+)		NEG	II	Luminal A
392	G	C	42	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
396	G	G	75	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	NEG		POS	III	Luminal B
397	G	G	64	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG		NEG	II	Luminal A
399	G	G	82	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A

402	G	C	68	Carcinoma Ductal Colóide	POS	POS	NEG (0)		POS	I	Luminal A
404	G	G	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS (>50%)	NEG		POS	I	Luminal A
408	G	G	60	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (0)		NEG	I	Luminal A
470	G	C	67	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	III	Luminal A
478	G	G	30	Câncer de mama pouco diferenciado							
484	G	G	50	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor						II	
492	G	G	22	Carcinoma Ductal Invasor						II	
497	G	C	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
498	G	G	83	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
499	G	G	78	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS			NEG	II	Luminal
501	G	C	53	Carcinoma Túbulo-Lobular Invasor	POS	POS	NEG		POS	I	Luminal A
504	G	C	63	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG			NEG	III	
506	G	G	55	Carcinoma Túbulo-Lobular Invasor	POS	POS				II	Luminal
508	G	G	39	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
509	G	G		Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS (5-10%)	POS		NEG	II	Luminal B
515	G	G	63	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	I	Luminal A
520	G	G	71	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		POS	II	Luminal B
521	G	C	68	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
523	G	G	34	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
524	G	G	53	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
525	G	G	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	III	Luminal A
527	G	G	53	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS		POS	II	HER2+
528	G	G	42	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	I	Luminal A
529	G	G	46	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	POS		NEG	II	Luminal B
530	G	C	44	Carcinoma Medular	NEG		NEG		POS	III	
535	G	C	79	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor					NEG	II	
536	G	G	40	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		POS	II	Luminal B
537	G	C	69	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
538	G	G	72	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		NEG	I	Luminal B
539	G	G	55	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS		POS	III	HER2+
540	G	G		Carcinoma Invasor						I	
543	G	G	78	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		NEG	II	Luminal B
544	G	C	50	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS(5-10%)	NEG		POS	III	Luminal B
545	G	G	27	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG		NEG	III	Triplo Negativo
546	G	C	30	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
551	G	C	50	Carcinoma Ductal Invasor	POS				POS	II	Luminal
558	G	C	51	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		NEG	III	Luminal B
559	G	C	79	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS		NEG	III	HER2+
560	G	G	39	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	NEG		POS	II	Luminal B
562	G	G	49	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
563	G	G	41	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
564	G	C	75	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	II	Luminal A
566	G	G	33	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS		Luminal A
568	G	G	43	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
570	G	C	55	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	II	
572	G	C	73	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
574	G	C	45	Carcinoma Lobular Invasor							
575	G	C	36	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
576	G	C	38	Carcinoma Ductal Invasor						III	
577	G	G	43	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG		POS	III	Triplo Negativo
578	G	G	38	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
579	G	C	33	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	NEG		NEG	II	Luminal B
581	G	G	47	Carcinoma Ductal Invasor					POS	III	
582	G	G	39	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	NEG		NEG	III	Luminal B
583	G	G	51	Carcinoma Ductal Invasor					POS	I	
584	G	C	59	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG		POS	II	Triplo Negativo
585	G	G	66	Carcinoma Lobular Invasor	POS	NEG	NEG		POS	II	Luminal B
587	G	C	65	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	III	Luminal A
588	G	C	54	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		POS	II	Luminal B
589	G	C	47	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS		NEG	III	Luminal B
590	G	C	51	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	POS		NEG	III	Luminal B
591	G	G	42	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	POS	NEG		NEG	I	?
592	G	C	48	Carcinoma Apócrino Invasor	NEG	POS	POS		POS	II	?
594	G	G	37	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS		POS	III	HER2+
595	G	C	60	Carcinoma Ductal Invasor					NEG	III	
596	G	G	49	Carcinoma Lobular Invasor					POS	I	
597	G	G	50	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	POS	NEG		POS	III	?
598	G	C	62	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG (1+)		POS	II	Triplo Negativo
600	G	G	37	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS (+2) / (+3)		POS	III	Luminal B
602	G	G	44	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS (+3)		NEG	II	Luminal B
603	G	C	58	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	II	Luminal A
605	G	C	82	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS (+2) / (+3)		NEG	II	Luminal B
606	G	G		Carcinoma Ductal Invasor							
607	G	G	29	Carcinoma Ductal Invasor	POS (30-50%)	POS (30-50%)			NEG	I	Luminal A
610	G	G	61	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50-80%)	POS (10%)	POS (+3)		POS	II	Luminal B
611	G	C	58	Carcinoma Invasor							
612	G	G	62	Carcinoma Ductal Invasor	inconclusivo*	POS (30-50%)	POS (+3)		NEG		Luminal B
613	G	G		Carcinoma Ductal Invasor							
617	G	G	65	Carcinoma Papilar Invasivo	POS (>50%)	POS (>50%)					Luminal



618	G	G	31	Câncer de mama pouco diferenciado					POS	III	
619	G	G	75	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50-80%)	POS (10-30%)	NEG (0)		NEG		Luminal A
620	G	G	44	Carcinoma Ductal Invasor	POS (10-30%)	POS (30-50%)	POS (+2)		NEG	II	Luminal B
621	G	C	77	Carcinoma Lobular Invasor					NEG	I	
622	G	G	71	Carcinoma Ductal Invasor	POS (>80%)	POS (40%)			POS	I	Luminal
625	G	G	33	Carcinoma Ductal Invasor							
627	G	G	62	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50-80%)	POS (30%)	NEG (0)				Luminal A
628	G	C	77	Carcinoma Ductal Invasor	POS (30%)	NEG	NEG				Luminal B
630	C	C	50	Carcinoma Ductal Invasor					POS	I	
631	G	G	54	Carcinoma Ductal Invasor	POS (10%)	POS (5-10%)	POS (+3)				Luminal B
632	G	G		Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS (10-30%)	NEG		POS	II	Luminal
633	G	G	70	Carcinoma Ductal Invasor	POS (5-10%)	POS (30%)	POS (+3)				Luminal B
634	G	C	53	Carcinoma Ductal Invasor							
635	G	C	61	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	POS	NEG		POS	I	?
636	G	C	34	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG				Triplo Negativo
638	G	G	48	Carcinoma Lobular Invasor	POS (30-50%)	POS (30-50%)	NEG (0)				Luminal A
640	G	C	36	Carcinoma Ductal In Situ	POS (0,5%)	NEG	POS (+2)				Luminal B
641	G	G	58	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG				Triplo Negativo
643	G	G	66	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG				Triplo Negativo
645	G	G	63	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50%)	POS (30-50%)	NEG (0)				Luminal A
647	G	C	56	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
648	C	C	33	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	II	Luminal A
649	G	C	44	Carcinoma Ductal Invasor	POS (70%)	POS (30%)					Luminal
650	G	G	42	Carcinoma Ductal Invasor	POS (80%)	POS (70%)	POS (+3)				Luminal B
651	G	G	56	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		POS	II	Luminal A
652	G	C	47	Carcinoma Lobular Invasor	POS (50-80%)	POS (30%)	NEG				Luminal A
653	C	C	62	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG	10-15%			Triplo Negativo
654	G	G	70	Carcinoma Lobular Invasor	NEG	NEG	NEG				Triplo Negativo
655	G	G	45	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor							
656	G	G	72	Carcinoma Ductal Invasor	POS (>66%)	POS (66%)	POS (+2)				Luminal B
658	G	G	61	Carcinoma Ductal Invasor	POS (~100%)	POS (20%)	NEG				Luminal A
659	C	C	66	Carcinoma Invasor	POS (20-30%)	POS (10%)	IND (?)	5-8%			Luminal A
661	G	C	67	Carcinoma Ductal Invasor	POS (>50%)	POS (>50%)	NEG				Luminal A
662	G	C	35	Carcinoma Medular	POS (5%)	POS (10-30%)	NEG	60-70%			Luminal B
663	C	C	44	Carcinoma Ductal Invasor	POS (30-50%)	POS (50-80%)		20-30%			Luminal B
665	G	G	57	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50-80%)	POS (50%)	POS (+3)	5-8%			Luminal B
666	G	C	34	Carcinoma Ductal Invasor							
669	G	G	72	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	5%			Luminal A
674	G	C	65	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS (3-5%)	NEG	20%	NEG	II	Luminal B
675	G	G	53	Carcinoma Mucinoso Invasor	POS (50%)	POS (40%)	NEG				Luminal A
676	G	C	48	Carcinoma Lobular Invasor	POS (30-50%)	POS (30-50%)					Luminal
677	G	G	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS (>50%)	POS (50%)	NEG				Luminal A
678	G	G	48	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG	30%	NEG	III	Triplo Negativo
679	G	C	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS (>66%)	POS (33%)	POS (+3)	5%			Luminal B
680	G	G	62	Carcinoma Mucinoso Invasor					NEG	I	
681	G	C	49	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS (80%)	NEG		NEG	II	Luminal A
682	G	G	33	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	I	Luminal A
683	G	C	49	Carcinoma Mucinoso Invasor	POS	POS	NEG		NEG	II	Luminal A
684	G	G	86	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG		NEG	III	Luminal A
685	G	C	83	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS (50%)	NEG		NEG	III	Luminal A
686	G	G	32	Carcinoma Ductal Invasor					POS	II	
687	G	G	46	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS(50-80%)	NEG			I	Luminal A
688	G	C	49	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50-80%)	POS (30%)		30-40%			Luminal B
689	G	C	51	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	POS	NEG		POS	II	?
690	G	C	71	Carcinoma Lobular Invasor	POS (80%)	POS (50%)	NEG	20-30%			Luminal B
691	G	G	64	Carcinoma Ductal Invasor	POS (5-10%)	POS (30-50%)	POS (+3)	15-20%			Luminal B
693	G	C		Carcinoma Mucinoso Invasor						I	
694	G	C	74	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS (+2)	40%			HER2+
695	G	G	64	Carcinoma Ductal In Situ	POS (70%)	NEG	POS (+3)				Luminal B
697	G	C	80	Carcinoma Ductal Invasor	POS (50-80%)	POS (50%)	NEG	5-10%			Luminal A
698	G	C	73	Carcinoma Ductal Invasor	POS (80%)	POS (10-30%)	NEG	5-10%			Luminal A
699	G	G	46	Carcinoma Ductal Invasor			NEG				
700	G	G		?	POS	POS	NEG	60%			Luminal B
701	G	C	78	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor	POS	POS (80%)	NEG		NEG	II	Luminal A
705	C	C	46	Carcinoma Ductal	POS	POS	NEG				Luminal A
706	G	G	42	Carcinoma Micropapilar Invasor	NEG	NEG	POS	20%			HER2+
707	C	C	55	Carcinoma Ductal associado a Carcinoma Micropapilar	POS	POS	NEG	10%			Luminal A
711	G	G	42	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS	5%	POS	II	Luminal B
714	G	G	72	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG	5%	NEG	II	Luminal A
715	G	G	42	Carcinoma Ductal In Situ	NEG	NEG	POS				HER2+
718	G	C	45	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	POS	NEG	20-30%			
719	G	C	53	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG	20%			Luminal B
724	G	G	84	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS(+3)	60%	POS	III	HER2+
727	G	C	58	Carcinoma Micropapilar Invasor	POS	POS	NEG	20%			Luminal B
731	G	G	61	Carcinoma Ductal In Situ	POS						
733	G	G	34	Carcinoma Ductal Invasor	POS (10%)	NEG	NEG	60-65%	POS	III	
747	G	C	80	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	50%	NEG	II	Luminal B
752	G	C	40	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG	38%	NEG	III	Triplo Negativo

753	G	C	39	Carcinoma Ductal Invasor	NEG (1%)	NEG (1%)	NEG(+1)	80%	POS	III	Triplo Negativo
754	G	G	51	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor	POS	POS	NEG	50-60%	NEG	III	Luminal B
758	G	C	46	Carcinoma Ductal Invasor	pos	pos	NEG	>10%	POS		Luminal B
759	G	G	78	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	10%	NEG	III	Luminal A
762	G	G	65	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	5-10%	NEG	I	Luminal A
765	G	G	73	Carcinoma Mucinoso Invasor	POS	POS	NEG	10%	NEG	II	Luminal A
767	G	C	82	Carcinoma Mucinoso Invasor	POS	POS	0	10%	NEG	II	Luminal A
782	G	C	34	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG(+1)	5%	NEG	II	Luminal A
783	G	C	80	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG(+2)	10%		II	Luminal A
784	G	C	42	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS(+3)	50%	POS	II	Luminal B
785	G	G	69	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor	POS	POS	NEG(+1)	10%	NEG	II	Luminal A
790	G	G	58	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor	POS	POS	NEG(+1)	10%	NEG	I	Luminal A
791	C	C	78	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	42%	NEG	III	Triplo Negativo
793	G	C	48	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	5%	POS		Luminal A
795	G	C	58	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	10%	NEG	II	Luminal A
796	G	C	70	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	10%			Luminal A
799	G	G	53	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG	50%	POS		Triplo Negativo
803	G	G	69	Carcinoma Ductal	POS	POS	NEG	5%	POS		Luminal A
806	G	G	48	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	FISH duvidoso	3000%	POS		Luminal B
807	G	C	43	Carcinoma Ductal	POS	POS	NEG	500%	NEG		Luminal A
808	G	G	36	Carcinoma Ductal In Situ	NEG	NEG	NEG	7000%			Triplo Negativo
809	G	C	44	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	POS (FISH)	20%	NEG	II	Luminal B
810	G	C	35	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	80%	NEG	III	Triplo Negativo
815	G	C	58	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	POS(+3)	23%	NEG	I	Luminal B
816	G	C	48	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	30%	NEG	III	Luminal B
817	G	C	60	Carcinoma Ductal Invasor	pos	pos	NEG(+1)	1500%	POS	I	Luminal B
818	C	C	48	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	10-15%	NEG	I	Luminal A
820	G	G	55	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+2)	10%	NEG	II	Luminal A
823	G	G	59	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	5-10%	NEG		Luminal A
825	G	C	41	Carcinoma Ductal In Situ	NEG*	NEG*	NEG(0)*	50%	POS		Triplo Negativo
829	G	C	57	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	neg (FISH)	10%	POS	II	Luminal A
831	G	G	48	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	duvidoso (FISH)	40%	NEG	III	Luminal B
832	C	C	90	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	neg (FISH)	50%	NEG	II	Triplo Negativo
836	G	C	69	Carcinoma Tubular Invasor	POS	NEG	NEG(+1)	10%	NEG	I	
840	G	G	63	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	20%	POS	III	Luminal B
841	G	G	48	Carcinoma Invasor	NEG	NEG	NEG	80%	POS	III	Triplo Negativo
844	C	C	53	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	(+2)*	40-50%	POS	III	HER2+
845	G	C	48	Carcinoma Ductal In Situ	POS	POS	NEG(+2)	5%	NEG		Luminal A
847	G	G	80	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	70%	POS	III	Luminal B
852	G	G	76	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	30%	POS	III	Luminal B
857	G	C	56	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	POS(+3)	80%	POS	III	Luminal B
860	G	G	45	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	15%	NEG	I	Luminal B
861	G	G	60	Carcinoma Ducto-Lobular Invasor	POS	POS (5%)	NEG(+2)	13%	POS	I	
866	G	C	51	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG	60%	POS	III	Triplo Negativo
870	G	C	52	Carcinoma Ductal In Situ	POS	POS	POS(+3)	20-25%			Luminal B
871	G	C	65	Carcinoma Ductal In Situ	POS	POS (fraco)	POS	30-40%	POS		Luminal B
872	G	C	40	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	POS(+3)	80%	NEG		Luminal B
874	G	G	44	Carcinoma Ductal Invasor	POS	NEG	NEG(0)	20%	POS	III	
875	G	C	41	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+2)	5-10%	NEG	II	Luminal A
878	G	G	71	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG(+2)	10%	NEG	II	Luminal A
879	G	G	50	Carcinoma Ductal In Situ	POS	POS		50%	NEG		
880	G	G	56	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	POS(+2)	20%	NEG	II	Luminal B
882	G	G	55	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	10-20%	NEG	II	Luminal B
884	C	C	82	Carcinoma Mucinoso Invasor	POS	NEG	NEG	25%	NEG	II	Luminal B
884	G	C	82	Carcinoma Mucinoso Invasor	POS	NEG	NEG	25%	NEG	II	
885	G	C	64	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	20-25%	POS		Luminal B
891	G	C	24	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	(+2)	60-65%		III	HER2+
892	G	G	50	Carcinoma Invasor	POS	NEG	NEG(0)	80%	NEG	III	
894	G	C	58	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	20%	NEG	II	Luminal B
895	G	C	71	Carcinoma Ductal Invasor	POS*	POS*	NEG(+2) - FISH	55%*	NEG	II	Luminal B
896	G	C	35	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	30%	POS	III	Luminal B
900	G	G	49	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	10%	NEG	I	Luminal A
901	G	C	61	Carcinoma Ductal In Situ	POS	POS	NEG(0)	17%	NEG	II	Luminal B
907	G	G	54	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG	5-10%	NEG	II	Luminal A
909	G	G	53	Carcinoma Túbulo-Lobular Invasor	POS	POS	NEG(0)	8%	NEG	I	Luminal A
914	G	C	87	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	90-95%	NEG	III	Triplo Negativo
928	G	G	39	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	60%	NEG	II	Triplo Negativo
930	G	G	32	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	60%	NEG	II	Luminal B
944	G	G	35	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (0)	80-85%	POS	II	Luminal B
946	G	G	76	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	15%	NEG	II	Luminal B
947	G	C	52	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (0)	40%	POS	II	Luminal B
952	G	C	65	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	90%	POS	III	Triplo Negativo
954	G	G	65	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	8%	NEG	II	Luminal A
955	G	C	53	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	80%	POS	III	Triplo Negativo
956	G	G	67	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	80%	POS	III	Triplo Negativo
957	G	G	46	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	10%	NEG	II	Luminal A
960	G	C	31	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	80%	NEG	III	Triplo Negativo
961	G	C	36	Carcinoma Ductal In Situ	NEG	NEG	POS	40%	NEG	II	HER2+
964	G	G	83	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+2) - FISH	40%	NEG	II	Luminal B

965	G	C	60	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	30-40%	NEG	II	Luminal B
966	G	G	65	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	20%	NEG	II	Luminal B
967	G	G	34	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS(+2)	75%	NEG	III	HER2+
969	G	G	52	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	NEG(0)	95%	NEG	III	Triplo Negativo
971	G	C	57	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	20%	NEG	II	Luminal B
972	G	G	61	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(+1)	10%	NEG	II	Luminal A
974	G	C	39	Câncer de mama pouco diferenciado	NEG	NEG	NEG(0)	85%	POS		Triplo Negativo
975	C	C	50	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	50%	NEG	III	Luminal B
976	G	G	63	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG(0)	13%	NEG	II	Luminal A
984	G	C	71	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (0)	10%	NEG	I	Luminal A
986	G	C	62	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	5%	NEG	I	Luminal A
987	G	C	25	Câncer de mama pouco diferenciado	NEG	NEG	NEG	97%	NEG	III	Triplo Negativo
990	G	C	76	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG	10%	NEG	II	Luminal A
992	G	C	61	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (0)	10%	NEG	III	Luminal A
993	G	G	35	Carcinoma Ductal Invasor	POS	POS	NEG (0)	5%	NEG	II	Luminal A
995	G	C	59	Carcinoma Ductal Invasor	NEG	NEG	POS	20%	NEG	II	HER2+
1006	G	C	85	Carcinoma Lobular Invasor	POS	POS	NEG (0)	10%	NEG	II	Luminal A
1012	G	C	52	Carcinoma Invasor	POS	POS	NEG(0)	13%	POS	III	Luminal A